



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

“Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) utilizando el método Superficie Respuesta”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Albert Hans NARCISO VALVERDE

Rosario Isabel PAUCAR ANDÍA

ASESOR

Gladys Constanza ARIAS ARROYO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Narciso A, Paucar R. “Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) utilizando el método Superficie Respuesta” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) utilizando el método Superficie Respuesta"

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**ROSARIO ISABEL PAUCAR ANDÍA Y
ALBERT HANS NARCISO VALVERDE**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE: 18 (DIECIOCHO)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 11 de febrero de 2019


Dr. Luis Miguel Visiñación Félix Veliz
Presidente


Q.F. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes
Miembro


Q.F. Walter Rivas Altez
Miembro


Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Gladys Valverde, por su motivación para lograr esta meta, por ser inspiración y razón de mi vida; a mi padre Duclaux Joly por su apoyo constante, su confianza y palabras de aliento en todo momento; a mis hermanos Steven y Pamela por confiar en mí y estar a mi lado; a Zoe por alegrar mis días, los quiero mucho. A mi familia Narciso Valverde por acompañarme en este logro. A Isabel que siempre me acompaña en los malos, buenos y grandes momentos como ahora en nuestra tesis.

Albert Hans Narciso Valverde

Este trabajo está dedicado a mis padres Isabel y Alejandro por su esfuerzo, por la hermosa familia que somos, por creer en mí, por apoyarme y brindarme su amor y consejos; a mis hermanos Janet y Jesús por su alegría y compañía en todo momento; a mi madrina Juana por su cariño y apoyo constante. A mis tíos y primos por estar a mi lado siempre. A Hans, por su compañía, gran paciencia, apoyo y motivación a lo largo del desarrollo de nuestra tesis.

Rosario Isabel Paucar Andía

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la asesora de nuestra tesis, Dra. Gladys Arias Arroyo, por ser nuestra guía en la realización de este trabajo, sin su apoyo y dirección, este trabajo no sería posible.

A la profesora Marina Marín Vallejos por su entusiasmo, apoyo y valiosas enseñanzas para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado examinador y calificador: Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz, Q.F. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes, Q.F. Walter Rivas Altez y Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña, por el tiempo otorgado a la revisión de este trabajo y sus valiosas recomendaciones para mejora de la misma.

A todos los docentes de nuestra Facultad, por sus enseñanzas, dedicación y entrega total por hacer de nuestra profesión un referente de nuestra sociedad.

A mi querida madrina Juana Andía por su ayuda para la realización de este trabajo, que sin ella no habría sido posible.

A todos los que nos apoyaron para poder concretar este proyecto, compañeros y colaboradores, Wendy, Stephany y Jossimar, muchas gracias.

A nuestros grandes amigos de la querida promoción ingresante 2012 por compartir alegrías, experiencias y esta hermosa profesión.

Agradecer a nuestra alma mater la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a nuestra querida Facultad de Farmacia y Bioquímica por los conocimientos adquiridos en ella y formarnos para llegar a ser buenos profesionales.

ABREVIATURAS

MSR:	Método Superficie Respuesta.
DBB:	Diseño Box Behnken.
DCC:	Diseño Compuesto Central.
CCF:	Cromatografía de Capa Fina.
M/S (%):	Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.
t (h):	Tiempo en horas.
T °C:	Temperatura en grados centígrados.
UV:	Ultravioleta.
CCFAC:	Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.
JECFA:	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
ARD:	Azúcares Reductores Directos.
ART:	Azúcares Reductores Totales.
A.O.A.C.:	Association of Official Analytical Chemists.
INACAL:	Instituto Nacional de Calidad.
NTP:	Norma Técnica Peruana.
USP:	United States Pharmacopeia.
GI:	Grado de libertad.
HSD:	Diferencia honestamente significativa.
SC Ajust.:	Sumas ajustadas de los cuadrados.
MC Ajust.:	Cuadrados medios ajustados.
Ee:	Error estándar.

RESÚMEN

El presente trabajo es una investigación experimental, transversal y prospectiva cuyo propósito fue la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango), fruto de una especie arbórea perteneciente a la familia Anacardiaceae, que fue obtenido en el caserío Longar, provincia y departamento de Ica. Asimismo, se buscó optimizar la obtención del colorante mediante la metodología Superficie Respuesta (MSR) para determinar los factores óptimos de obtención del colorante tales como: solvente, temperatura, relación entre muestra y solvente, pH y tiempo, los cuales se verificaron experimentalmente con el fin de mejorar la obtención del colorante. Para la optimización y el análisis estadístico se empleó el programa informático Minitab 18 y Statgraphic centurión XVI. La parte experimental consistió de tres etapas: primero, una etapa preliminar donde se determinó solvente, temperatura, relación entre muestra y solvente, pH y tiempo; la segunda etapa, que consistió en realizar un diseño factorial completo general donde se probaron los factores relación entre muestra y solvente, pH y tiempo; la tercera etapa, donde se realizó un diseño Box Behnken del método Superficie Respuesta para determinar las condiciones óptimas de obtención del colorante. Se obtuvo un extracto de una concentración de 49,09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango), a una relación entre muestra y solvente de 20, 5 % a pH 9,1, y durante 2,16 horas de tratamiento.

Palabras clave: colorante, *Mangifera indica* L., optimización, superficie respuesta.

SUMMARY

The present work is an experimental, transversal and prospective investigation whose purpose was to obtain the dye from the fruit pulp of *Mangifera indica* L. (mango), fruit of an arboreal species belonging to the family Anacardiaceae, which was obtained in the Longar hamlet, province and department of Ica. Furthermore, it was sought to optimize the obtaining of the dye by the methodology Response Surface (MSR) to determine the optimal factors of obtaining of the dye such as: solvent, temperature, relation between sample and solvent, pH and time, which they were verified experimentally with the In order to improve the obtaining of the dye. To the optimization and statistical analysis, the computer program Minitab 18 and Statgraphic centurion XVI were used. The experimental part consisted of three stages: first, a preliminary stage where solvent was determined, temperature, relation between sample and solvent, pH and time; the second stage, which consisted in carrying out a general complete factorial design where the factors relationship between sample and solvent, pH and time were tested; the third stage, where a Box Behnken design of the Surface Response method was made to determine the optimal conditions for obtaining the dye. Obtaining an extract of a concentration of 49.09 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ of dye from the pulp of the fruit of *Mangifera indica* L. (mango), with a relation between sample and solvent of 20.5% at pH 9,1 and during 2,16 hours of treatment.

Key words: coloring, *Mangifera indica* L., optimization, response surface.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
2. GENERALIDADES	4
2.1 <i>Mangifera indica</i> L. (mango)	4
2.1.1. Origen	4
2.1.2. Nombres comunes	4
2.1.3. Clasificación Taxonómica	5
2.1.4. Descripción botánica	5
2.1.5. Usos	6
2.1.6. Beneficios del mango	7
2.2. Colorantes	8
2.3. Clasificación de colorantes	9
2.3.1. Colorantes naturales	9
2.4. Colorantes del mango	14
2.4.1. Mangiferina	14
2.5. Diseño factorial	15
2.6. Metodología Superficie Respuesta	16
2.6.1. Diseños Compuestos Centrales (DCC)	17
2.6.2. Diseños Box Behnken	17
2.6.3. Optimización de la obtención de colorante usando MSR	18
3. PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1. Materiales, Reactivos y Equipos	19
3.2. Métodos	21
3.2.1. Recolección de la muestra	21
3.2.2. Selección y clasificación de la muestra	21
3.2.3. Acondicionamiento de la muestra	21

3.2.4. Obtención del extracto etanólico de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	22
3.2.5. Análisis Fitoquímico de la muestra	22
3.2.6. Cromatografía de Capa Fina (CCF)	25
3.2.7. Evaluación Químico Bromatológica	25
3.3. Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	29
3.3.1. Primera etapa: Pruebas preliminares para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	29
3.3.2. Evaluación y determinación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido mediante las pruebas preliminares.	33
3.3.3. Segunda etapa: Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	34
3.3.4. Evaluación y determinación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido mediante el Diseño Factorial Completo General.	37
3.3.5. Tercera etapa: Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L., mediante Método Superficie Respuesta, por el diseño Box Behnken.	38
3.3.6. Evaluación y optimización del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido mediante Método Superficie Respuesta, por el diseño Box Behnken.	40
3.3.7. Evaluación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido a condiciones óptimas.	41
3.3.8. Aplicación del colorante en gelatina.	44
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSIÓN	79
6. CONCLUSIONES	85
7. RECOMENDACIONES	86
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9. ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de <i>Mangifera indica</i> L. previo a selección.	6
Figura 2. Ponche a base de mango.	7
Figura 3. Síntesis de molécula de Mangiferina.	14
Figura 4. Molécula de Mangiferina. Nombre IUPAC: 1,3,6,7-tetrahydroxy-2 [(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]xanthen-9-one	15
Figura 5. Diagrama de la evaluación químico bromatológica de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	28
Figura 6. Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de la muestra de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	46
Figura 7. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. según la composición del solvente.	50
Figura 8. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. según la temperatura.	52
Figura 9. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. según la relación entre muestra y solvente.	55
Figura 10 Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. según el pH del medio de extracción.	56
Figura 11. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. según el tiempo de tratamiento.	59
Figura 12. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para concentración del colorante µg/µL.	63
Figura 13. Gráfica de efectos principales para concentración del colorante µg/µL.	64
Figura 14. Interacción entre factores del Diseño Factorial Completo General.	65
Figura 15. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para Concentración del colorante µg/µL.	70
Figura 16. Gráfica de probabilidad normal de residuos para concentración del colorante µg/µL.	71
Figura 17. Histograma de residuos para concentración del colorante µg/µL.	71
Figura 18. Superficie de respuesta de concentración del colorante µg/µL versus M/S (%), pH.	72

Figura 19. Superficie de respuesta de concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus M/S (%), t (h).	72
Figura 20. Superficie de respuesta de concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus pH, t (h).	73
Figura 21. Gráficas de contornos para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus M/S (%), pH y t.	73
Figura 22. Gráfica de Optimización de obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 23. Constancia de clasificación taxonómica de <i>Mangifera indica</i> L.	96
Figura 24. Clasificación de la fruta de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	97
Figura 25. Pesado de la fruta de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	97
Figura 26. Análisis fitoquímico de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	98
Figura 27. Medida de grados Brix de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	98
Figura 28. Determinación de fibra.	98
Figura 29. Determinación de proteínas.	99
Figura 30. Determinación de proteínas, etapa de destilación.	99
Figura 31. Determinación de azúcares reductores directos.	100
Figura 32. Determinación de grasas.	100
Figura 33. Ensayos según el diseño Box Behnken para análisis organoléptico	101
Figura 34. Extracto del colorante obtenido de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) según las condiciones óptimas.	101
Figura 35. Determinación de cloruros del colorante obtenido de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) según las condiciones óptimas.	102
Figura 36. Ensayo de solubilidad del colorante obtenido de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) según las condiciones óptimas.	102
Figura 37. Prueba de estabilidad con diferentes pH y temperatura.	103
Figura 38. Prueba de aplicación de 0 y 1 mL del colorante en gelatina.	103
Figura 39. Prueba de aplicación de 2, 2,5 y 3 mL del colorante en gelatina.	103
Figura 40. Resultados de análisis de plomo y arsénico	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de un colorante.	8
Tabla 2. Ventajas y desventajas del colorante artificial y el colorante natural.	10
Tabla 3. Análisis Fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	24
Tabla 4. Condiciones empleadas para la separación del pigmento amarillo de mango por cromatografía de capa fina (CCF).	25
Tabla 5. Solventes utilizados para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	30
Tabla 6. Condiciones de temperatura utilizadas para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	31
Tabla 7. Relación entre muestra y solvente utilizados para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	31
Tabla 8. Condiciones de pH utilizadas para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	32
Tabla 9. Condiciones de tiempo utilizados para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	33
Tabla 10. Parámetros de evaluación organoléptica de las pruebas preliminares de obtención del colorante.	33
Tabla 11. Diferentes niveles de factores para el Diseño Factorial Completo general.	35
Tabla 12. Diseño Factorial Completo General.	36
Tabla 13. Parámetros de evaluación organoléptica de los ensayos del Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante.	37
Tabla 14. Rango de variables a diferentes niveles para la optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L., mediante Método Superficie Respuesta, por el diseño Box Behnken.	38
Tabla 15. Diseño Box Behnken del Método Superficie Respuesta (MSR).	39
Tabla 16. Parámetros de evaluación organoléptica de los ensayos del diseño Box Behnken para la obtención del colorante.	40

Tabla 17. Parámetros de evaluación organoléptica del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido mediante condiciones óptimas.	41
Tabla 18. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	44
Tabla 19. Rendimiento de la muestra de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	45
Tabla 20. Análisis Fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	45
Tabla 21. Cromatografía de capa fina de la muestra de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	46
Tabla 22. Composición Químico Bromatológico de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	47
Tabla 23. Evaluación Organoléptica de las pruebas preliminares para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	48
Tabla 24. Selección de solvente en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	49
Tabla 25. Tabla ANOVA de la comparación del solvente en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	49
Tabla 26. Tratamiento a diferentes temperaturas en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	51
Tabla 27. Tabla ANOVA para comparación de las temperaturas de obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	51
Tabla 28. Relación entre muestra y solvente utilizados en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	53
Tabla 29. Tabla ANOVA para comparación de la relación entre muestra y solventes utilizados en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	53
Tabla 30. Comparación de grupos homogéneos según Test de Tukey.	54

Tabla 31. Comparaciones múltiples test de Tukey (HSD) para diferente relación entre muestra y solvente en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	54
Tabla 32. Condiciones de pH utilizadas en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	55
Tabla 33. Tabla ANOVA para comparación de los pH de obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	56
Tabla 34. Tiempos de extracción en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	57
Tabla 35. Tabla ANOVA para comparación de los tiempos de obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	57
Tabla 36. Comparación de grupos homogéneos según Test de Tukey.	58
Tabla 37. Comparaciones múltiples test de Tukey (HSD) para diferentes tiempos en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	58
Tabla 38. Evaluación Organoléptica de los ensayos del Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	60
Tabla 39. Concentraciones del colorante obtenido con el Diseño Factorial Completo General.	61
Tabla 40. Análisis de varianza del Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	62
Tabla 41. Evaluación Organoléptica de los ensayos del diseño Box Behnken para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango).	66
Tabla 42. Colorante obtenido de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) mediante la interacción de los parámetros óptimos según el diseño Box Behnken.	67
Tabla 43. Resumen del diseño Box Behnken.	68

Tabla 44. Regresión de superficie respuesta: concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vs. M/S (%), pH, t (h).	68
Tabla 45. Análisis de varianza de los ensayos del diseño Box Behnken.	69
Tabla 46. Parámetros de la optimización de respuesta del diseño Box Behnken.	74
Tabla 47. Evaluación Organoléptica del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido a condiciones óptimas.	75
Tabla 48. Evaluación fisicoquímica del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido a condiciones óptimas.	75
Tabla 49. Ensayos de solubilidad del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. obtenido a condiciones óptimas.	76
Tabla 50. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango), mediante la lectura de absorbancias a 377 nm (mangiferina).	76
Tabla 51. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) mediante análisis fisicoquímico y organoléptico.	77
Tabla 52. Ensayos de aplicación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) en gelatina.	78
Tabla 53. Análisis fisicoquímico del ensayo de aplicación del colorante de la pulpa del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. (mango) en gelatina.	78

1. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con innumerables riquezas como recursos naturales, los cuales en el transcurso de la historia han demostrado mediante el uso popular los beneficios que otorgan a nuestra salud.

Un grupo de los recursos muy considerado en nuestro país y que han incrementado su consumo a nivel mundial son las frutas tropicales, ya que son poseedoras de atractivas características sensoriales, pero además poseen otras propiedades benéficas para la salud debido a la presencia de bioactivos en ellas como: polifenoles, carotenos, etc.; y su composición con un alto contenido de fibra, minerales y vitaminas.^{1, 2}

Uno de los productos de exportación más representativos en nuestro país es el mango (*Mangifera indica* L.), que actualmente afronta una mayor demanda de producción exigida por el mercado internacional.^{3, 4}

El mango en estadio maduro es famoso por su fuerte aroma, coloración intensa de la cáscara, sabor delicioso, gran cantidad de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, β -caroteno, vitamina C y minerales; que varían según la ubicación del cultivo, la variedad, la etapa de madurez, etc.^{4, 5}

Se han utilizado durante siglos tintes naturales para producir colores para telas, hilos, cuero, alimentos, etc. Las técnicas de teñido primitivas incluían pegar plantas a la tela o frotar pigmentos triturados en la tela. Con el tiempo, se desarrollaron nuevas técnicas que utilizaban tintes naturales de frutas trituradas, bayas y otras plantas, que se hervían en la tela. Los métodos naturales de extracción de tinte y los métodos de teñido descritos por los tintoreros tradicionales son incompletos, por lo que existe una necesidad de desarrollar y estandarizar métodos nuevos para la extracción y purificación de colorantes naturales.^{6, 7, 8}

El uso de tintes naturales no alérgicos, no tóxicos y respetuosos con el medio ambiente en los textiles se ha convertido en una cuestión de importancia significativa debido a la mayor conciencia ambiental con el fin de evitar el uso de

tintes sintéticos peligrosos. Se espera que el impacto en el mercado de los tintes naturales aumente en los próximos años a gran y pequeña escala.⁹

El mercado de los colorantes naturales (como aditivos alimentarios) ha crecido enormemente y se espera que para el año 2020, represente 2,5 billones de dólares a nivel mundial.¹⁰

En los últimos años, se ha desarrollado un creciente interés por el uso potencial de los residuos de plantas como materia prima para producir tinte natural para el teñido de textiles debido a los aspectos ambientales.⁹ El presente estudio trata sobre la extracción del colorante natural de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

La metodología Superficie Respuesta (MSR) es una herramienta útil para la optimización de procesos. Con ésta se puede estudiar la influencia de variables independientes sobre una o varias respuestas y obtener un modelo matemático capaz de reproducir el comportamiento, realizando pocos experimentos.^{11, 12}

Debido a estas características el método superficie respuesta (MSR) ha demostrado ofrecer varias ventajas en comparación con los métodos clásicos los cuales usan la técnica de "una variable a la vez"; que toman más tiempo y son necesarios un gran número de experimentos para explicar el comportamiento de un sistema.^{13, 14}

En el presente trabajo, se optimiza la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. en función de la cantidad en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del colorante presente en el extracto, determinado por espectrofotometría UV, haciendo una evaluación del modelo obtenido mediante la aplicación del MSR.

Por lo expuesto anteriormente pensamos que es importante este trabajo, dado que debemos consumir de preferencia productos naturales como el mango y los resultados de este proyecto contribuirán en la posibilidad de contar con un colorante amarillo natural de este recurso promisorio.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general:

- Optimizar la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) utilizando el método superficie respuesta.

1.1.2. Objetivos específicos:

- Seleccionar y evaluar los parámetros de extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).
- Establecer los parámetros óptimos de extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) aplicando el diseño Box Behnken de la metodología superficie respuesta.
- Evaluar y analizar el colorante obtenido de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

1.2 HIPÓTESIS

- Optimización en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) mediante el método superficie respuesta por el diseño Box Behnken, estableciendo los parámetros óptimos de extracción y obteniendo un colorante que cumple con los límites establecidos para otros colorantes amarillos.

2. GENERALIDADES

2.1 *Mangifera indica* L. (mango)

Mangifera indica L., conocido comúnmente como mango, es una especie arbórea, perteneciente a la familia de las anacardiáceas, que comprende más de 70 géneros, donde el género *Mangifera* comprende cerca de 30 especies y *Mangifera indica* L. es la más representativa.⁴

Esta especie nativa del Asia tropical, naturalizada en muchas de las áreas en donde ha sido introducida está distribuida mayormente en bosques naturales a altitudes de entre 300 y 900 msnm, pero también se ha cultivado con éxito a altitudes desde el nivel del mar hasta 1,500 m, a pesar de que crece mejor a menos de 600 m de altitud. Más de 1000 variedades de mango están disponibles en todo el mundo, sin embargo, solo unas pocas se cultivan a escalas comerciales.⁴

2.1.1. Origen

Se han realizado estudios cromosómicos y citológicos con el propósito de establecer el lugar de desarrollo inicial del mango, indicándose que aparentemente la península malaya sería el centro de origen del género, con una posterior propagación de la especie y máxima diversificación en la India, Birmania, Tailandia, Indonesia, Borneo y Filipinas.¹⁵

Sin embargo, otros autores reportan que el mango es probablemente nativo de los bosques montañosos bajos del este de la India, Bangladesh y Myanmar (Burma).^{16, 17}

2.1.2. Nombres comunes

La presencia de un nombre y una referencia en sánscrito en la literatura sánscrita antigua sugiere que el mango era conocido por la gente de la India desde sus orígenes. Además, su nombre malayo “mangga”, atestigua su origen exótico, ya que es la misma palabra que el “mangai” de la lengua tamil

del sur de la India. La palabra mango se originaria ya en el siglo XVI a partir de la antigua palabra tamil 'mangai'.^{6, 15}

2.1.3. Clasificación taxonómica

La muestra fue clasificada por el Museo de Historia Natural (UNMSM-2018), según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Mangifera*

Especie: *Mangifera indica* L.

Nombre vulgar: “mango de chupar”

2.1.4. Descripción botánica

Es una especie arbórea de hoja perenne, con un sistema radicular profundo y vigoroso, y su corteza es gruesa y rugosa. Suele alcanzar un gran tamaño y su altura puede superar los 30 metros de altura.⁴

Las hojas adultas son de color verde oscuro, alternas, enteras, simples y coriáceas, de forma variable entre elípticas y lanceoladas.¹⁸

La inflorescencia es una panícula terminal ramificada, donde se desarrollan numerosas flores masculinas y hermafroditas. Ambos tipos de flores poseen 4-5 sépalos pequeños y verdes y 5 pétalos pequeños de color variable con tonos rojos, verdes o amarillos.¹⁸

La fruta de mango es una drupa constituida exteriormente por la cáscara o exocarpo, una parte comestible, el mesocarpo, y un hueso cartilaginoso o endocarpo que encierra la semilla, la cual puede contener uno o más embriones. El peso de los frutos varía desde 0,2 kg hasta 2 kg y en forma, desde redondeada hasta ovoide, arriñonada y a veces aplanada lateralmente. El color de la cáscara varía también dependiendo del cultivar, pudiendo ser verde, amarillo, rosa, rojo, púrpura, o una combinación de éstos.^{6, 18}



Figura 1. Frutos de *Mangifera indica* L. previo a selección.

2.1.5. Usos

Alimentarios: se procesa y se utiliza en casi todas las etapas de su crecimiento. La gama de productos incluye los derivados de frutas tanto crudas como maduras.

El fruto en su estadio inicial (verde), se usa comúnmente para la preparación de ensaladas o salsas, encurtidos y bebidas. Mientras que, en estadio maduro, su fruto de pulpa carnosa y dulce destaca por su buena combinación de olor y sabor característicos, haciendo óptimo su empleo para obtener jugo, néctar, rebanadas enlatadas, mermelada, bebidas instantáneas, puré de mango,

toffee y barras de mango. Es muy común el uso tradicional para la preparación de bebidas como ponche de mango en actividades costumbristas. ⁶

Medicinal: la pulpa del fruto del mango se emplea como laxante, diurético, antiácido, analgésico, y astringente. Se reporta su uso como excelente depurativo para el organismo y también para combatir el insomnio. Tradicionalmente se tratan afecciones respiratorias con una mezcla de pulpa de mango y miel. ¹⁹

Su efecto antiinflamatorio ha sido ampliamente investigado, demostrándose que el contenido de fitoquímicos ejerce actividad antiinflamatoria en diversas patologías crónicas asociadas a inflamación como colitis ulcerosa. ²⁰



Figura 2. Ponche a base de mango.

2.1.6. Beneficios del mango

El mango también es una importante fuente de fibra dietaria, Aparte de su alto contenido en fructosa, sacarosa y glucosa, es una fuente de heteropolisacaridos. El mango además se caracteriza por presentar un contenido elevado de vitaminas, minerales y antioxidantes que benefician contra enfermedades. ²¹

2.2. COLORANTES

Según su composición química, el colorante es un compuesto orgánico que resulta de transiciones electrónicas entre orbitales moleculares y consta de una estructura que produce color (cromóforo, receptor de electrones) y una parte que regula las propiedades de coloración, adherencia y solubilidad (auxócromo, donador de electrones) y están unidos a un anillo bencénico insaturado. Los cromógenos o cromóforos son cuerpos aromáticos que se muestra en las bandas de absorción en el espectro visible.^{22, 23}

Tabla 1. Estructura de un colorante.

CROMÓFOROS	AUXÓCROMOS
Grupo nitroso -NO (o =N OH)	Grupo sulfónico -HSO ₃
Grupo nitro -NO ₂ (o =NOOH)	Grupo nitro -NO ₂
Grupo etilénico >C=C<	Grupo hidroxilo -OH
Grupo azoico -N=N-	Grupo carboxílico -COOH
Grupo carbonilo -C=O	Grupo amino -NH ₂
Grupo imina >C=NH	
Grupo tio -C=S	

El color es la primera característica que percibe el consumidor ya que da indicios sobre su calidad y seguridad al asociarla con otras cualidades como estado y frescor. El color también puede modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y olor, influyendo en el éxito o fracaso de un alimento en el mercado.^{24, 25}

La utilidad de los colorantes como aditivos radica en generar color o potenciar la belleza de los alimentos. Su objetivo es mejorar su aspecto y hacerlos más agradables a la vista (respuesta mental al estímulo luminoso), provocando apetito y predisponiendo así a la venta.^{23, 26}

2.3. CLASIFICACIÓN DE COLORANTES

De forma general se pueden clasificar según su origen y distinguirlos en colorantes naturales y sintéticos o artificiales. Pero se puede también tener en cuenta la naturaleza química, lo que permite agruparlos en función de su solubilidad o de su reactividad; por ejemplo, los colorantes azoicos, los derivados polifenólicos, las estructuras tetrapirrólicas, etc.^{25, 27}

2.3.1. Colorantes Naturales

Los colorantes artificiales o sintéticos según las regulaciones oficiales de la Unión Europea y EE. UU. han sido restringidos debido a sus efectos adversos en la salud, como alergias leves o graves.²⁸ Por consiguiente, en la actualidad la finalidad es seguir investigando para reemplazar parcial o totalmente los colorantes sintéticos por otros colorantes más confiables y que no dañen la salud.²⁹

Para su producción industrial los colorantes naturales se extraen de las materias primas que en su mayoría los contienen: frutas y verduras, lo que, en desventaja, los hace más caros, menos estables y con menos poder de colorante que sus correspondientes artificiales. Pero a pesar de ello existe un creciente desarrollo, utilización y consumo de colorantes naturales en la actualidad, y esto debido a las propiedades adicionales que ofrecen como la disminución de la contaminación al emplear menos componentes sintéticos, y beneficios de las propiedades farmacológicas de sus bioactivos.³⁰

Entre los principales colorantes naturales empleados están las clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides, taninos y las betalaínas; siendo muy útiles en la industria alimentaria, por lo que es de gran importancia mantener su estabilidad tomando en cuenta los factores que la afectan principalmente: la temperatura, la luz, el oxígeno y el pH.²⁹

Tabla 2. Ventajas y desventajas del colorante artificial y el colorante natural.^{28, 30}

Colorante artificial o sintético	Colorante natural
Ventajas	
Sustancias presentes en su composición, protegen de la oxidación a los alimentos donde se incorporan.	Están presentes en fuentes naturales como frutas y verduras, por lo que poseen propiedades funcionales: anticancerígenos, antiinflamatorios o antidiabéticas, entre muchas otras.
Ofrece mayor cantidad de tonalidades según el gusto del consumidor.	Aceptados por el consumidor debido a su origen natural.
Estabilidad ante cambios de pH, temperatura y presión durante el procesamiento de los alimentos.	Se mantienen estables a ciertas condiciones de almacenamiento fáciles de adecuar.
Desventajas	
Pueden ser tóxicos y mutagénicos.	Algunos como los carotenos, pueden llegar a ser tóxicos si son consumidos en elevadas cantidades.
Tienen en su composición, sustancias químicas para mantener su estabilidad.	Son bastantes inestables ante cambios de pH, luz, el oxígeno, temperatura durante el procesamiento del alimento.

2.3.1.1. Colorantes Alimentarios

El color y apariencia de un producto son cualidades importantes y trascendentales para el consumidor al momento de evaluar su adquisición ya que asocian su percepción de las bondades del producto con la calidad del mismo.²⁴

Es de gran interés en la industria alimentaria mantener una apariencia agradable en sus productos por lo que son agregados en pequeñas cantidades a los alimentos sea en cualquier etapa de la producción con fines de mejorar el aspecto o las propiedades del producto final.³¹

Se entiende como colorante alimentario a las sustancias que añaden u otorgan color a un alimento y son provenientes de sustancias alimenticias u otras fuentes naturales que normalmente no son consumidas como alimento en sí, ni son usadas como ingredientes básicos en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento es con fines tecnológicos.^{32,}

33

Un aditivo de color, como se define en la regulación, es cualquier tinte, pigmento u otra sustancia que puede impartir color a un alimento, medicamento, cosmético o al cuerpo humano. Los aditivos de color son componentes importantes de muchos productos, haciéndolos atractivos, apetitosos e informativos. Una de las funciones de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) es garantizar que los aditivos de color se usen de manera segura y apropiada.³⁴

Entre las razones por las que son adicionados a los alimentos están:

- Otorgar o devolver al producto su apariencia original en caso el color natural haya sido menguado por tratamientos tecnológicos del proceso como: tratamientos térmicos, tratamientos enzimáticos, pelados y desecaciones.
- Preservar la identidad del alimento.
- Para ser indicador visual de buena calidad del alimento.
- Garantizar la uniformidad de las tonalidades, evitando variaciones naturales de la intensidad de estas.^{35, 36}

2.3.1.2. Colorantes Permitidos

La Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos de 1938 (FDCA), de los EEUU, es aquella que regula todo lo referido a la seguridad y control de los alimentos.

Esta ley, atribuye la autoridad legal sobre los alimentos a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), para el control de: ingredientes añadidos,

aditivos y los requisitos de etiquetado. Según el marco de esta ley, se han ido estableciendo enmiendas y adecuándola a las distintas regulaciones específicas de aplicación de la ley.³⁴

Los colorantes alimentarios, a la par de ser considerados como aditivos, cuentan con una determinada legislación como lo es la enmienda de 1960 que demanda para todo colorante de uso en alimentación, previamente ser procesado y autorizado por la FDA.³⁴

Diversos aditivos fueron eliminados o retirados por las industrias, ya que debían someterse a la nueva legislación, confirmándose como aditivos seguros solo 90 de 200 que se utilizaban anteriormente.

Se clasifican en:

- a) **Colorantes certificados:** son los colorantes artificiales, cuyos lotes deben ser comprobados por el fabricante y la FDA para asegurar el cumplimiento de los requisitos de pureza necesarias. En la actualidad se cuenta con doce colorantes artificiales certificados cuyo uso en alimentación está aprobado en Estados Unidos: FD&C Blue No. 1, FD&C Blue No. 2, FD&C Green No. 3, Orange B, Citrus Red No. 2, FD&C Red No. 3, FD&C Red No. 40, FD&C Yellow No. 5 y FD&C Yellow No. 6.; para productos agroalimentarios, medicamentos y cosméticos respectivamente.³⁴
- b) **Colorantes exentos de certificación:** este tipo de colorantes no requieren la comprobación que se exige a los colorantes certificados. Aquí se incluyen los pigmentos derivados de fuentes naturales como por ejemplo los vegetales, minerales o animales. Sin embargo, al igual que los colorantes certificados, también deben cumplir con sus correspondientes requisitos de pureza y límites de uso predicho en la legislación. ejemplo de colorante exento de certificación es el color caramelo, producido comercialmente calentando azúcar y otros carbohidratos bajo condiciones controladas.³⁴

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) es el órgano especializado en evaluación de riesgos para aditivos, contaminantes y sustancias tóxicas naturales presentes en los alimentos, mientras que el Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) desempeña la correspondiente función de gestión de riesgos, ratificando las dosis máximas de empleo sólo con respecto a los aditivos para los que el JECFA:

- Ha establecido especificaciones de identidad y pureza
- Ha completado una evaluación de la inocuidad o ha efectuado una evaluación cuantitativa de riesgos.³²

El CCFAC también formula recomendaciones a la Comisión del Codex Alimentario sobre la posible adopción de las especificaciones del JECFA como especificaciones orientativas del Codex. Las autoridades nacionales de control de los alimentos utilizan las especificaciones orientativas con fines de observancia, y para asegurar de que los aditivos objeto de comercio internacional cumplen las normas acordadas, pudiendo también servirse de las especificaciones orientativas del Codex para la elaboración de sus propias normas reguladoras.³²

La Dirección de Autorizaciones Sanitarias por Resolución Directoral N° 139-2012-DIGEMID-DG-MINSA en Perú, tiene dentro de la lista de colorantes permitidos el amarillo y sus tonalidades. Así también, la Norma Técnica Peruana NTP 209.038.2009, conforme con el Codex Alimentario, norma los requisitos que deben cumplir los aditivos y el etiquetado de los alimentos envasados como los colorantes.^{33, 39}

2.4. COLORANTES DEL MANGO

2.4.1. Mangiferina

La mangiferina es un polifenol que se produce por una ruta biosintética como la de la figura 3 y está ampliamente distribuida en plantas superiores de las familias Anacardiaceae, Gentianaceae y Guttiferae.⁴⁰ Llamada también C-glucosilxantona, se caracteriza por ser resistente a la hidrólisis química y enzimática, a diferencia de las xantonas O-glicósido, donde el azúcar, está unida por un enlace carbono - oxígeno al núcleo que es sensible a hidrólisis.^{41, 42, 43}

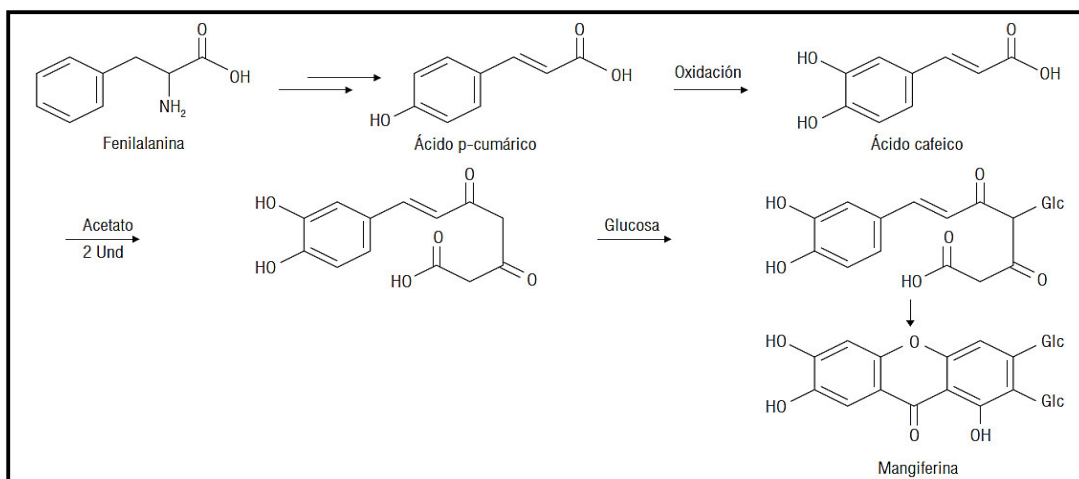


Figura 3. Síntesis de molécula de Mangiferina.

La mangiferina es la más frecuente de este tipo de moléculas y está presente en 60 especies, 18 géneros y 13 familias de dicotiledóneas. Puede estar asociada con C-glucoflavonas, pero no de otras xantonas, por lo que se ha usado como marcador en estudios quimiotaxonómicos.^{44, 45}

Es un compuesto fenólico y representativo de las xantonas, que cuenta con grandes propiedades biológicas como antidiabéticas, antiinflamatorias, antihistamínicas y antitumorales. Además, se considera a las xantonas como los “superantioxidantes” más potentes que existen, propiedad que es valorada altamente en la industria farmacéutica, cosmética y nutracéutica.⁴⁵

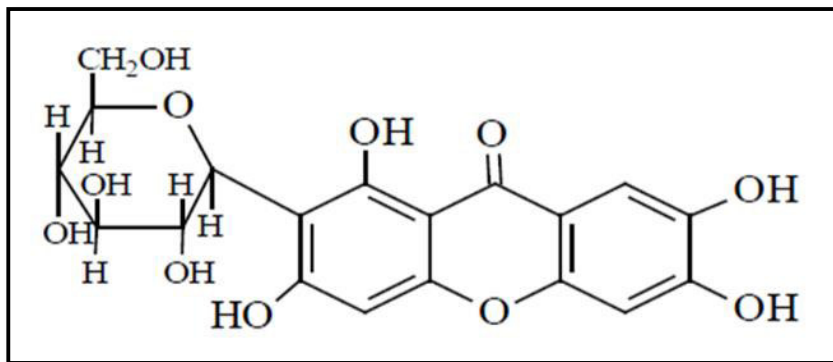


Figura 4. Molécula de Mangiferina. Nombre IUPAC: 1,3,6,7-tetrahydroxy-2-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]xanthen-9-one.

2.5. DISEÑO FACTORIAL

El diseño factorial es un orden experimental en el cual un número de niveles (p) son elegidos para cada factor (k), donde se establecen p^k ensayos por experimento. De modo que, si se selecciona 2 niveles para cada uno de 3 factores que se analizarán el número de ensayos será de 2^3 , es decir 8 ensayos.⁴⁶

Un diseño factorial completo es cuando se hace uso de todos los ensayos posibles y las respuestas son determinadas siguiendo las combinaciones de los distintos niveles de los factores experimentales. Estas combinaciones por individual, se denominan ensayo, cuya medición de respuesta será una observación, y el conjunto de ensayos viene a ser el "diseño".⁴⁷

De la misma manera los diseños factoriales fraccionados, son aquellos empleados con la finalidad de reducir tiempos y costos del diseño. Este tipo de diseño excluye una o más combinaciones de niveles en la creación del diseño y tienen la utilidad de poder explorar factores, debido a que minimizan la cantidad de ensayos a un número que pueda manejarse sin dificultad. Aquellos ensayos que resultan en el diseño vienen a ser una fracción del diseño factorial completo. No obstante, al no realizar todas las combinaciones de los niveles de los factores, existe una posibilidad de confusión en los efectos.⁴⁸

2.6. METODOLOGÍA SUPERFICIE RESPUESTA (MSR)

Es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas para diseñar experimentos, construir modelos, evaluar los efectos de factores y buscar condiciones óptimas de factores para respuestas de procesos y formulaciones complejas. El proceso de optimización de esta metodología se enfoca en estudiar la respuesta de las combinaciones diseñadas estadísticamente, estimar los coeficientes ajustándolos a un modelo matemático que se adapte mejor a las condiciones experimentales, prediciendo la respuesta del modelo ajustado y verificando la adecuación de la manera deseable.^{49, 50} De igual modo, la respuesta será un valor cuantitativo y la prioridad de la superficie de respuesta es optimizar o maximizar este valor; con ello reduce el número de ensayos experimentales útiles para evaluar múltiples parámetros y sus interacciones. Estas cualidades lo hacen menos trabajoso y requerir menos tiempo que otros enfoques.^{50, 51, 52, 53}

Esta metodología se emplea para distintas necesidades como:

- Obtener magnitudes de factores (valores de sus niveles) que generen la óptima respuesta o cumplan lo establecido para el funcionamiento de un proceso.
- La identificación de condiciones del proceso que deriven en una mejoría que se evidencia en la calidad del producto, en comparación a los resultados de la calidad obtenidos con las condiciones actuales.
- Obtener un modelo de interacción entre los factores experimentales y la respuesta.⁵⁴

Para emplear metodología Superficie Respuesta se precisan más de una sola etapa de experimentación o análisis.⁵⁴ Comúnmente se siguen los pasos mostrados a continuación, pero estos cambian a un distinto orden según el tipo de experimento, o se elimina alguno de ellos:

- i. Definir cuáles son los factores influyentes, aquellas condiciones que producen una influencia sobre el valor de la variable respuesta.

- ii. La generación del diseño estadístico, pudiendo ser un diseño Central Compuesto o un diseño Box Behnken.
- iii. Llevar a cabo los ensayos y recoger los resultados de la variable respuesta según el diseño estadístico elegido.
- iv. De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, se evalúa el diseño de superficie respuesta.
- v. Representar con la gráfica de superficie respuesta y de contornos el modelo de la superficie de respuesta para su mejor visualización.
- vi. Optimizar la respuesta del proceso.⁵⁴

2.6.1. Diseños compuestos centrales (DCC)

Son empleados comúnmente en las ocasiones que se requiere de un diseño experimental secuencial, ya que estos diseños dan opción de incorporar la información de un experimento factorial planificado acertadamente. Los puntos factoriales y centrales que arroja el diseño se pueden ajustar como un modelo de primer orden (lineal), cumpliendo la función de una etapa preliminar, y al mismo tiempo brindan evidencia sobre la importancia de un aporte para una curvatura de segundo orden.⁴⁷

2.6.2. Diseños Box Behnken

Es un diseño esférico y giratorio, se ha aplicado en la optimización de procesos químicos y físicos debido a su diseño de razonamiento y excelentes resultados.⁵⁵

El diseño Box Behnken es una técnica multivariable de segundo orden que se basa en diseños factoriales incompletos, y que han recibido una amplia aplicación para la evaluación de diversas condiciones experimentales críticas, tales como una función de respuesta máxima o mínima. El número de experimentos (N) necesarios para el desarrollo del diseño experimental de Box Behnken se define como $N = 2k(k-1) + C_0$, donde (k) es el número del factor y (C₀) es el número replicado del punto central.^{56, 57}

A causa de la menor cantidad de puntos de diseño que poseen los diseños de Box-Behnken, el uso de este diseño resulta menos costoso que la realización de los diseños centrales compuestos (DCC) para un mismo número de factores. Los DBB a la vez pueden ser de utilidad si se conoce la región de trabajo segura del proceso a estudiar, mientras que los DCC usualmente tienen puntos axiales fuera de la región de trabajo segura, pero dichos puntos pudieran no ser de la región de interés, o ser imposible su realización debido a que se ubican fuera de los límites de una operación segura.⁴⁷

2.6.3. Optimización de la obtención del colorante usando MSR

La optimización mediante el método de superficie respuesta ofrece varias ventajas al permitir la implementación de sistemas económicos, acortar los procesos unitarios y mejora la calidad de los mismos ya que permite obtener una gran cantidad de información en un pequeño número de experimentos empleando como base condiciones previamente seleccionadas de experimentaciones justificadas mediante modelos matemáticos y estadísticos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.1.1. Materiales

Se emplearon materiales de vidrio en general y otros:

- Aros de soporte
- Balón Kjeldahl
- Buretas
- Crisoles
- Desecadores
- Embudo Buchner
- Embudos de vidrio
- Espátulas
- Fiolas
- Filtro de gooch
- Licuadora
- Matraces
- Matraz kitasato
- Papel de filtro
- Pipetas
- Placas Petri
- Probetas
- Soporte universal
- Tubos de ensayo
- Soporte universal
- Vasos de precipitado

3.1.2. Equipos

- Balanza analítica OHAUS Modelo Pioner TM.
- Campana extractora.
- Cocina eléctrica Práctika pro
- Equipo de Baño María digital Marca MEMERT

- Espectrofotómetro UV Marca GENESIS
- Estufa de secado. Rango: 20 – 200 °C
- Licuadora Marca Oster.
- Mufla RELES. Rango: 0 – 1500 °C.
- Sistema extracción Soxhlet.
- Termómetro (-10 – 150 °C).
- Digestor Kjeldahl
- Refractómetro Giardina Italy
- Potenciómetro
- Refrigeradora

3.1.3. Reactivos

- Ácido cítrico.
- Agua oxigenada
- Azul de metileno 1% en etanol p.a.
- Cl_3Al
- CuSO_4 p.a.
- Éter etílico p.a.
- HCl QP
- H_2SO_4 QP
- Metanol grado reactivo
- Solución de NaOH 40%
- Solución de NaOH 0,1N
- Solución de H_2SO_4 0,1N
- Solución de fenolftaleína 0,1% en etanol p.a.
- Solución de rojo de metilo p.a.
- Solución de Fehling A, B p.a.
- Glucosa estándar p.a.
- Estándar de Ácido Ascórbico, Marca MERCK
- Estándar de mangiferina, Marca Sigma Aldrich

3.2. MÉTODOS

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Bromatología, y en el laboratorio del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras del fruto de mango utilizadas correspondieron a la especie *Mangifera indica* L. variedad “mango de chupar” cultivadas en el caserío de Longar, distrito San Juan Bautista, provincia y departamento de Ica, Perú. (Mes de julio del año 2018). El método que se empleó fue aleatorio. Se obtuvieron 3 canastas de 40 kg.

3.2.2. SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Se seleccionaron los frutos que se encontraban en buen estado y sin magulladuras; fueron lavados con agua destilada y secados. Se procedió a clasificarlos según su estado de madurez: en verdes, pintones, maduros y sobremaduros; escogiendo los frutos maduros para el presente estudio.

3.2.3. ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Se emplearon frutos frescos de mango que fueron lavados y secados. Se separó la pulpa del fruto de modo manual con la ayuda de cuchillos de acero inoxidable y se homogenizó con ayuda de una licuadora. Los ensayos realizados a la muestra fueron: análisis fitoquímico, cromatografía de capa fina, agua, proteínas, grasas, carbohidratos, azúcares reductores directos, azúcares reductores totales, fibra cruda, cenizas, % vitamina C, acidez, grados Brix, pH, y los ensayos de obtención del colorante.

3.2.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L.

Se pesó el homogenizado de pulpa y se realizó la extracción con etanol de 96°, luego se filtró y se procedió a concentrar en baño maría a 60°C, para obtener el extracto seco.

3.2.5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LA MUESTRA

Método: Según Olga Lock Sing de Ugaz.

Fundamento: el análisis fitoquímico es una técnica que sirve para poder identificar, mediante reacciones químicas, los metabolitos secundarios presentes en el extracto estudiado.⁵⁸

Procedimiento: Los metabolitos secundarios del extracto se identificaron mediante las técnicas descritas por Lock de Ugaz y el Manual de farmacognosia de la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.^{58,59}

Se empleó el extracto etanólico seco obtenido previamente para la realización de las pruebas, haciendo soluciones de 30 mg/mL de solvente.

- **Molish:** Se realizó la reacción donde se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo Molish A (solución de alfa-naftol 2 %) y en la reacción en zona se agregó diez gotas del reactivo de Molish B (ácido sulfúrico QP). La presencia de carbohidratos se confirma con la formación de un anillo violeta.
- **Antrona:** Reacción en zona. Se realizó la reacción donde se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo Antrona (solución de Antrona 1% en ácido sulfúrico QP). La presencia de carbohidratos se confirma con la presencia de coloración verde.
- **Ninhidrina:** Se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo de Ninhidrina (solución alcohólica de Ninhidrina 1%) y se calentó en baño

maría a 70°C durante 5 minutos. la presencia de aminoácidos libres se confirma con la presencia de coloración violeta.

- **Shinoda:** Se mezcló 1 mL del extracto con miligramos de magnesio y tres gotas de ácido clorhídrico QP La presencia de flavonoides se confirma con la presencia una coloración de acuerdo al flavonoide.
- **Fehling:** Se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo de Fehling A y 5 gotas del reactivo de Fehling B y calentó en baño maría a 70 °C durante 15 minutos. La presencia de azúcares reductores se confirma con la precipitación de rojo ladrillo.
- **Bornträger:** Se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo de Bornträger (solución de hidróxido de sodio al 5 %). La presencia de antraquinonas y naftoquinonas se confirma con la formación de un precipitado rojo o coloración roja,
- **Dragendorff:** Se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas de ácido sulfúrico a 10% y tres gotas del reactivo de Dragendorff, la presencia de alcaloides se confirma con la formación de un precipitado naranja ladrillo.
- **Tricloruro de hierro:** Se mezcló 1 mL del extracto con tres gotas de una solución alcohólica de Tricloruro de hierro 5%. La presencia de compuestos fenólicos se confirma con la presencia de coloración verde o azul.
- **Sonenheim:** Se mezcló una alícuota del extracto con tres gotas de ácido sulfúrico al 10 % y tres gotas del reactivo Sonenheim. La presencia de alcaloides se confirma con la formación de un precipitado azul-verdoso.
- **Saponinas:** Se agito enérgicamente una alícuota de extracto diluida en 5 mL de agua destilada, durante 10 minutos. La presencia de saponinas se confirma con la formación de una espuma estable por al menos 15 minutos.

- **Vainillin sulfúrico:** Se mezcló 1 mL del extracto con cinco gotas del reactivo de Vainillin (solución alcohólica al 5%) y en zona se agregó cinco gotas de ácido sulfúrico QP. La presencia de glicósidos se confirma con la formación de un anillo rojo pardo.

Tabla 3. Análisis Fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Metabolito	Reactivo
Carbohidratos (azúcares)	R. Molish
Carbohidratos (azúcares)	R. Antrona
Carbohidratos (azúcares reductores)	R. Fehling
Glicósidos	R. Vainillin sulfúrico
Flavonoides	R. Shinoda
Fenoles	FeCl ₃ 5%
Alcaloides	R. Dragendorff
Alcaloides	R. Sonenheim
Saponinas	Prueba de espuma
Grupos amino libres	R. Ninhidrina
Naftoquinonas y antraquinonas	R. Bortranger

3.2.6. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

Para la observación de los pigmentos presentes en la muestra de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., se efectuó la separación mediante cromatografía de capa fina. Se obtuvo 300µL del extracto alcohólico de mango, los cuales fueron aplicados mediante capilares en cromatofolios de aluminio con Silica gel G60 F254 de 2,5x8,5 cm. Se utilizó un estándar de mangiferina para la comparación.

Tabla 4. Condiciones empleadas para la separación del colorante amarillo de mango por cromatografía de capa fina (CCF).

Cromatografía	
Fase móvil	Metanol
Fase estacionaria	Silica gel G60 F254
Frente de solvente	6,5 cm
Revelador	Luz UV-visible

3.2.7. EVALUACIÓN QUÍMICO BROMATOLÓGICA

La evaluación químico bromatológica se realizó en el laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en el laboratorio del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, los estudios realizados fueron:

a) Agua

Método: Gravimétrico (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Pérdida de peso de la muestra por calentamiento en estufa a 105 °C hasta peso constante.

b) Proteínas totales

Método: Kjeldahl (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Digestión de la muestra en ácido sulfúrico QP, empleando catalizadores, para librar el nitrógeno de la proteína y transformarlo a sal

de amonio. En un medio básico el nitrógeno es liberado en forma de amoniaco, siendo destilado y recogido en una solución ácida de normalidad conocida, para su posterior valoración.

c) Grasas

Método: Soxhlet (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Extracción sólido-líquido con solvente éter etílico hasta su agotamiento y posterior determinación por diferencia de pesos.

d) Carbohidratos

Método: Matemático (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Se consigue por diferencia, restando el 100 % de la adición de proteínas, fibra cruda, extracto etéreo, cenizas y humedad.

e) Azúcares Reductores Directos (ARD)

Método: Fehling-volumétrico (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Reducción del cobre de la solución de Fehling en proporción volumétrica y formación de óxido cuproso en solución alcalina hirviente, debido a los azúcares de la muestra de análisis.

f) Azúcares Reductores Totales (ART)

Método: Fehling -volumétrico (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Reducción del cobre de la solución de Fehling en proporción volumétrica y formación de óxido cuproso en solución alcalina hirviente, debido a los azúcares de la muestra de análisis.

g) Fibra cruda

Método: Digestión ácida alcalina (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Mediante la digestión consecutiva con ácidos y álcalis diluidos en ebullición.

h) Cenizas

Método: Calcinación directa (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Destrucción y volatilización de la materia orgánica en forma de residuos óxidos y sales minerales.

i) Vitamina C

Método: Volumétrico 2,6 diclorofenolindofenol. (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: La vitamina "C" o ácido ascórbico posee la propiedad de ser altamente reductora, la oxidación del ácido ascórbico con un colorante redox, como el 2,6-diclorofenolindofenol (azul en medio básico y rojo en medio ácido), el cual se reduce en presencia de un medio ácido, a un compuesto incoloro.

j) Acidez Total

Método: Acidez titulable (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Neutralización de la acidez producida por la muestra en dilución acuosa con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

k) Sólidos solubles (°Brix)

Método: Refractometría (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento Medición de la refracción por un cambio de velocidad de la luz al pasar de un medio a otro de diferente densidad.

l) pH

Método: Potenciométrico (A.O.A.C. 2012)⁶⁰

Fundamento: Determinación de las diferencias en el potencial de un electrodo previamente calibrado usando soluciones buffer.

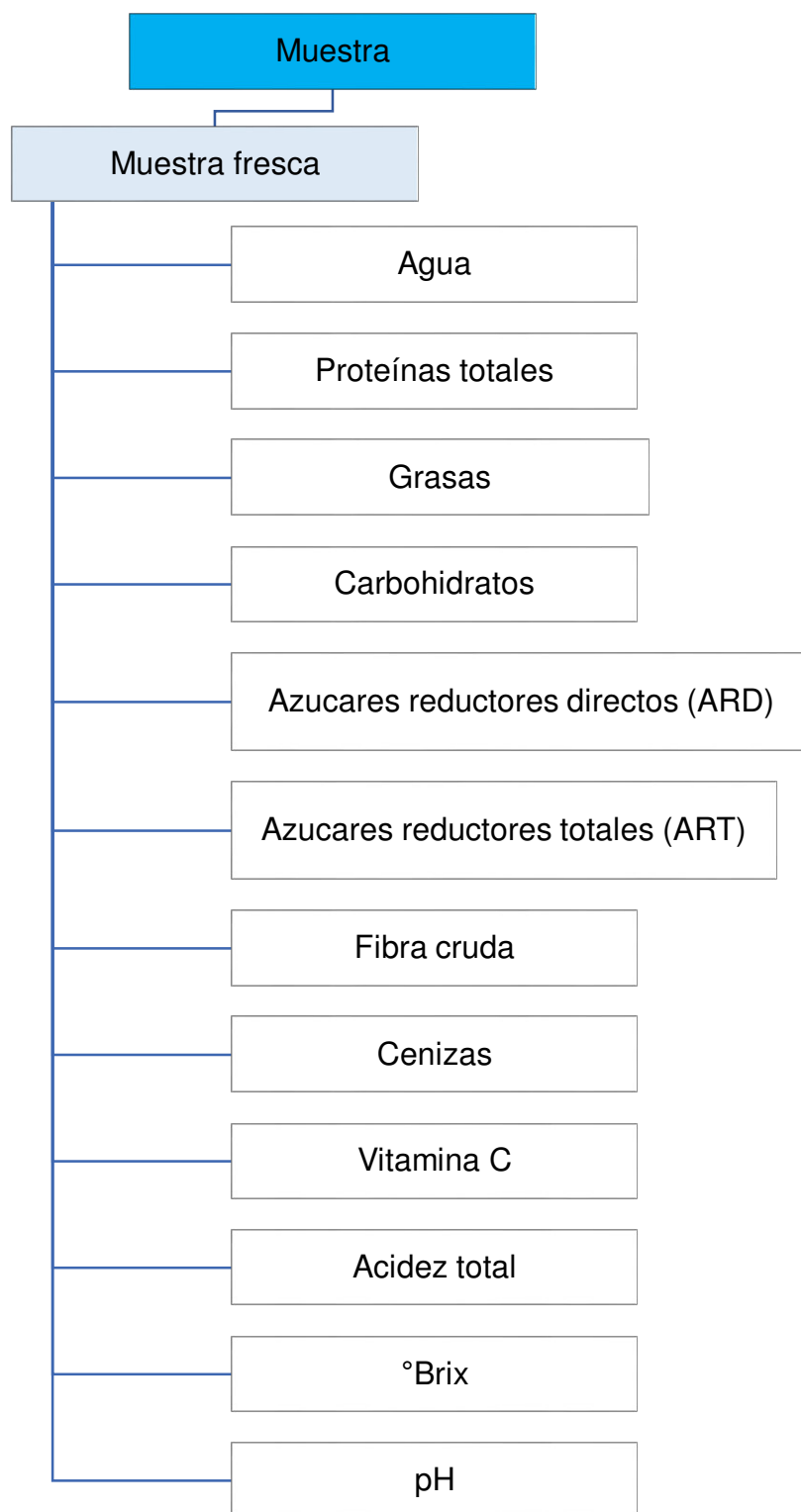


Figura 5. Diagrama de la evaluación químico bromatológica de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L.

3.3.1. PRIMERA ETAPA: PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA OBTENCIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L.

a. Recolección de la muestra

Se procedió como en el punto 3.2.1.

b. Selección y clasificación

Se procedió como en el punto 3.2.2.

c. Limpieza

Se lavaron los frutos del mango a chorro constante de agua potable y posterior lavado con agua destilada.

d. Corte

Se procedió a separar el fruto del mango en tres partes: cáscara, semilla y pulpa que luego se recogió en recipientes para pesarlos y registrarlos.

e. Pulpeado

El recojo de la pulpa y homogenización de la muestra se realizó mediante el licuado de la pulpa del mango.

f. Selección de parámetros de extracción del colorante natural

Para la extracción del colorante natural, se empleó un diseño factorial de un solo factor, en el cual se probaron y evaluaron 5 variables independientes: solvente, temperatura, relación entre muestra y solvente, pH y tiempo; en función a la determinación del contenido del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (variable dependiente). Las condiciones de extracción fueron seleccionadas de acuerdo a estudios previos.^{9, 10} Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se cuantificó por espectrofotometría UV-visible la cantidad del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) obtenido.

i. Selección del solvente

En la extracción del colorante, se empleó la relación 10% de muestra respecto a los solventes: agua destilada, etanol de 96° y agua destilada: etanol 96° (1:1). Se realizó el análisis a temperatura ambiente (22°C), pH 7 del solvente agua destilada, pH 6 para el etanol de 96° y agua destilada: etanol 96° (1:1); y tiempo de extracción de 2 horas (Tabla 5). El mejor solvente de extracción fue seleccionado en función al contenido del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. determinado por espectrofotometría UV-visible empleando mangiferina como estándar. La expresión de la concentración es µg mangiferina/µL de extracto.

Tabla 5. Solventes utilizados para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Parámetro	M/S (%)	Solvente	pH	t (h)	Temperatura (°C)
Selección: solvente	10	Agua destilada	7	2	Ambiente (22°C)
		Etanol 96°	6		
		Agua destilada: etanol 1:1			

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

ii. Selección de la temperatura de extracción:

El estudio se realizó empleando diferentes temperaturas: temperatura ambiente (22°C), 40°C y 80°C. La relación entre muestra y solvente fue de 10% y se utilizó como mejor solvente etanol 96°, estudiado previamente, y se empleó un tiempo de extracción de 2 horas (Tabla 6). El contenido de colorante fue determinado por espectrofotometría UV-visible empleando mangiferina como estándar.

Tabla 6. Condiciones de temperatura utilizadas para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Parámetro	M/S (%)	Solvente	pH	t (h)	Temperatura (°C)
Selección: temperatura	10	Etanol 96°	6	2	Ambiente (22°C)
					40
					80

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

iii. Selección de la relación entre muestra y solvente:

En la extracción del colorante, se empleó como solvente etanol 96°, se realizó el análisis a temperatura ambiente (22°C), pH del solvente 6, durante 2 horas y una relación entre muestra y solvente (pulpa de mango/ etanol 96°) en el rango de 10% a 50%. (Tabla 7). La mejor relación entre muestra y solvente fue seleccionada en función al contenido del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. determinado por espectrofotometría UV-visible empleando mangiferina como estándar. La expresión de la concentración es µg mangiferina/µL de extracto.

Tabla 7. Relación entre muestra y solvente utilizados para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Parámetro	Solvente	M/S (%)	pH	t (h)
Selección: relación entre muestra y solvente	Etanol 96°	10	6	2
		20		
		30		
		40		
		50		

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

iv. Selección del pH del medio de extracción:

El estudio se realizó empleando diferentes pH en un rango de 2 a 12, incrementando de 2 en 2. El solvente usado fue etanol 96°, se utilizó la mejor relación entre muestra y solvente (20%) estudiada anteriormente y se empleó el tiempo de extracción de 2 horas (Tabla 8). El contenido de contenido del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. fue determinado por espectrofotometría UV-visible empleando mangiferina como estándar. La expresión de la concentración es µg mangiferina/µL de extracto.

Tabla 8. Condiciones de pH utilizadas para la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Parámetro	Solvente	M/S (%)	pH	t (h)
Selección pH	Etanol 96°	20	2	2
			4	
			6	
			8	
			10	
			12	

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

v. Selección del tiempo de extracción:

El colorante de mango se extrajo empleando como solvente etanol de 96°, un porcentaje de muestra de 20% y pH 8 de tratamiento, los cuales fueron evaluados y seleccionados previamente. Se realizaron mediciones en intervalos de 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas. (Tabla 9). El contenido de contenido del colorante fue determinado por espectrofotometría UV-visible y expresado como µg mangiferina/µL de extracto.

Tabla 9. Condiciones de tiempo utilizados para la extracción de la pulpa del fruto del colorante de *Mangifera indica* L.

Parámetro	Solvente	M/S (%)	pH	t (h)
Selección tiempo	Etanol 96°	20	8	1h
				2h
				4h
				6h
				12h
				24h

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

3.3.2. EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L. OBTENIDO MEDIANTE LAS PRUEBAS PRELIMINARES.

- Análisis organoléptico:**

Los atributos analizados a los ensayos realizados fueron: aspecto y color.

Tabla 10. Parámetros de evaluación organoléptica de las pruebas preliminares de obtención del colorante.

Características organolépticas	
Aspecto	Homogéneo
	Turbio
Color amarillo	Muy leve
	Leve
	Moderado
	Intenso

- Análisis cuantitativo:**

Para cuantificar el colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango), se empleó mangiferina como estándar y se determinaron los espectros de absorción a una longitud de onda de 377 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible GÉNESIS 10S con celdas de un centímetro de paso óptico. Se realizaron las diluciones necesarias al estándar y la muestra, para la respectiva cuantificación. La expresión de la concentración es µg mangiferina/µL de extracto.

3.3.3. SEGUNDA ETAPA: DISEÑO FACTORIAL COMPLETO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangífera indica* L.

a. Recolección de la muestra

Se procedió como en el punto 3.2.1.

b. Selección y clasificación

Se procedió como en el punto 3.2.2.

c. Limpieza

Se procedió como en el punto 3.3.1.c.

d. Corte

Se procedió como en el punto 3.3.1.d.

e. Pulpeado

Se procedió como en el punto 3.3.1.e.

f. Diseño factorial para la obtención del colorante

Para la obtención del colorante se empleó un diseño factorial completo general, en el programa estadístico Minitab 18.

Se tomaron 3 factores a analizar los cuales fueron: relación entre muestra y solvente, pH y tiempo; y para cada factor se ensayaron 3 niveles como se observa en la tabla 11:

Tabla 11. Diferentes niveles de factores para el Diseño Factorial Completo General.

Variables independientes		Niveles		
		1	2	3
X1	M/S (%)	10	20	30
X2	pH	8	9	10
X3	t (h)	1	2	4

X1, X2, X3: Variables independientes.

1: Nivel inferior de la variable independiente, 2: Nivel medio de la variable independiente, 3: Nivel superior de la variable independiente.

M/S: Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

Se obtuvo el diseño matriz mediante el programa estadístico Minitab 18, estableciendo un diseño factorial completo, donde se obtuvieron 27 ensayos, provenientes de la aleatorización de los tres niveles de los 3 factores (variables independientes). Se muestran en la tabla 12 el total de ensayos aleatorizados tanto codificados como decodificados.

Tabla 12. Diseño Factorial Completo General.

Orden Corrida *	Bloques	A	B	C	M/S (%)	pH	t (h)
1	1	3	1	1	30	8	1
2	1	2	3	3	20	10	4
3	1	1	3	3	10	10	4
4	1	3	1	3	30	8	4
5	1	1	1	1	10	8	1
6	1	2	1	2	20	8	2
7	1	3	2	2	30	9	2
8	1	1	1	3	10	8	4
9	1	3	3	2	30	10	2
10	1	1	3	1	10	10	1
11	1	1	2	3	10	9	4
12	1	2	2	3	20	9	4
13	1	2	3	1	20	10	1
14	1	1	2	2	10	9	2
15	1	2	3	2	20	10	2
16	1	2	1	1	20	8	1
17	1	3	3	3	30	10	4
18	1	2	2	2	20	9	2
19	1	3	2	1	30	9	1
20	1	3	3	1	30	10	1
21	1	2	2	1	20	9	1
22	1	1	2	1	10	9	1
23	1	1	1	2	10	8	2
24	1	3	2	3	30	9	4
25	1	3	1	2	30	8	2
26	1	2	1	3	20	8	4
27	1	1	3	2	10	10	2

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

A, B y C: Variables independientes.

1: Nivel inferior de la variable independiente, 2: Nivel intermedio de la variable independiente, 3: Nivel superior de la variable independiente.

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

3.3.4. EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L. OBTENIDO MEDIANTE EL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO GENERAL

- **Análisis organoléptico:**

Los atributos analizados a los ensayos realizados fueron: aspecto y color.

Tabla 13. Parámetros de evaluación organoléptica de los ensayos del Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante.

Características organolépticas	
Aspecto	Homogéneo
	Turbio
Color amarillo	Muy leve
	Leve
	Moderado
	Intenso

- **Análisis cuantitativo:**

Para cuantificar el colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L (mango), se empleó mangiferina como estándar y se determinaron los espectros de absorción a una longitud de onda de 377 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible GÉNESIS 10S con celdas de un centímetro de paso óptico.

Se realizaron las diluciones necesarias al estándar y la muestra, para la respectiva cuantificación. La expresión de la concentración es µg mangiferina/µL de extracto.

3.3.5. TERCERA ETAPA: OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L., MEDIANTE MÉTODO SUPERFICIE RESPUESTA, POR EL DISEÑO BOX BEHNKEN

Luego de la determinación de la influencia de los factores la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., mediante el diseño factorial, se procedió con la siguiente etapa; establecer el diseño matriz del diseño Box Behnken. En el diseño Box Behnken se analizaron los 3 factores influyentes, cuyos niveles se detallan a continuación.

Tabla 14. Rango de variables a diferentes niveles para la optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., mediante Método Superficie Respuesta, por el diseño Box Behnken.

Variables independientes		Niveles		
		-1	0	+1
X1	M/S (%)	18	20	22
X2	pH	8,5	9	9,5
X3	t (h)	1,5	2,0	2,5

X1, X2, X3: Variables independientes.

-1: Nivel inferior de la variable independiente, 0: Nivel intermedio de la variable independiente, +1: Nivel superior de la variable independiente.

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

Empleando el diseño Box Behnken se analizó la influencia de los 3 factores seleccionados en la respuesta dependiente, mediante un diseño matriz establecido por el programa Statgraphics centurión XVI. Siguiendo este diseño se realizaron 15 ensayos, cada uno por triplicado. Resultando la tabla de diseño siguiente:

Tabla 15. Diseño de Box Behnken del Método de Superficie Respuesta (MSR).

Ensayo N°	Bloque	M/S (%)	pH	t (h)
1	1	18	9	2,5
2	1	22	9,5	2
3	1	20	8,5	1,5
4	1	18	8,5	2
5	1	20	9	2
6	1	20	9	2
7	1	20	9	2
8	1	18	9	1,5
9	1	22	9	1,5
10	1	20	8,5	2,5
11	1	20	9,5	1,5
12	1	22	8,5	2
13	1	18	9,5	2
14	1	20	9,5	2,5
15	1	22	9	2,5

M/S (%): Relación entre la muestra y solvente expresado en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

3.3.6. EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L. OBTENIDO MEDIANTE MÉTODO SUPERFICIE RESPUESTA, POR EL DISEÑO BOX BEHNKEN

- **Análisis organoléptico:**

Los atributos analizados a los ensayos realizados fueron: aspecto y color.

Tabla 16. Parámetros de evaluación organoléptica de los ensayos del diseño Box Behnken para la obtención del colorante.

Características organolépticas	
Aspecto	Homogéneo
	Turbio
Color amarillo	Muy leve
	Leve
	Moderado
	Intenso

- **Análisis cuantitativo:**

Para cuantificar el colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L (mango), se empleó mangiferina como estándar y se determinaron los espectros de absorción a una longitud de onda de 377 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible GÉNESIS 10S con celdas de un centímetro de paso óptico. Se realizaron las diluciones necesarias al estándar y la muestra, para la respectiva cuantificación. La expresión de la concentración es μg mangiferina/ μL de extracto.

- **Análisis de optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. mediante Método Superficie Respuesta, por el Diseño Box Behnken.**

La optimización se ejecutó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para el cual se utilizó el programa estadístico Minitab 18, donde se analizaron los resultados y se obtuvieron las gráficas de Pareto, probabilidad normal, superficie de respuesta y de contornos para conseguir las condiciones óptimas de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

3.3.7. EVALUACIÓN DEL COLORANTE DE LA PULPA DEL FRUTO DE *Mangifera indica* L. OBTENIDO A CONDICIONES ÓPTIMAS.

La evaluación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido a condiciones óptimas, fue desarrollada en el Laboratorio de Bromatología, y en el laboratorio del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los análisis de metales pesados plomo y arsénico se realizaron en el Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental-CICOTOX.

3.3.7.1. Evaluación organoléptica

Los atributos analizados fueron: color, olor, sabor y aspecto.

Tabla 17. Parámetros de evaluación organoléptica del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido mediante condiciones óptimas.

Características organolépticas	
Color	
Olor	
Sabor	Dulce
	Agridulce
	Ácido
Aspecto	Homogéneo
	Turbio

3.3.7.2. Evaluación Fisicoquímica

a. Determinación de materia volátil

Método: Gravimétrico (INACAL - NTP 209.214:1984).⁶¹

Fundamento: Método Gravimétrico en que se registra como materia volátil, la pérdida de masa de la muestra luego de un secado hasta peso constante.

b. Determinación de la materia insoluble en agua

Método: Gravimétrico (INACAL - NTP 209.214:1984)⁶¹.

Fundamento: Método Gravimétrico en que se registra como materia insoluble en agua, la pérdida de masa de la muestra luego de un filtrado (tipo Gooch) y lavar en agua fría hasta que este incoloro el filtrado y secado a peso constante.

c. Materia insoluble en alcohol

Método: Gravimétrico (INACAL - NTP 209.214:1984).⁶¹

Fundamento: Método Gravimétrico en que se registra como materia insoluble en alcohol, la pérdida de masa de la muestra luego de un filtrado (tipo Gooch) y lavado en alcohol hasta que este incoloro el filtrado y secado a peso constante.

d. Cloruros

Método: Volumetría de precipitación, Método de Mohr (INACAL - NTP 209.214:1984).⁶¹

Fundamento: una valoración de precipitación, donde el ión cloruro precipita como AgCl (cloruro de plata), utilizando como patrón una solución de AgNO₃ (nitrato de plata) de concentración conocida y como indicador el K₂CrO₄ (cromato de potasio) virando de una coloración amarilla a un precipitado rojo ladrillo de Ag₂CrO₄ (cromato de plata).

e. Sulfatos

Método: Gravimétrico (INACAL - NTP 209.214:1984)⁶¹

Fundamento: El sulfato presente en la muestra reacciona con el ion bario formando la sal sulfato de bario. Se eliminan las impurezas empleando agua destilada caliente donde el sulfato de bario es poco soluble y luego se deseca hasta masa constante hasta lograr

el desprendimiento total de agua y proceder a pesar el precipitado de sulfatos.

f. Extracto etéreo ácido y extracto etéreo alcalino

Método: Gravimétrico (INACAL - NTP 209.214:1984)⁶¹

Fundamento: Una cantidad determinada de muestra se somete a destilación etérea alcalina, obteniendo un extracto que es sometido a destilación etérea ácida hasta obtener un extracto alcalino que es desecado en estufa a 85°C hasta peso constante.

g. Solubilidad

Método: Según USP 40⁶²

Fundamento: Capacidad de disolución de una sustancia en diversos solventes se basa en que una sustancia es más soluble en un disolvente cuando sus estructuras están íntimamente relacionadas.

h. Plomo

Método: Espectrofotometría de Absorción Atómica.⁶²

Fundamento: La energía requerida para la atomización es obtenida aplicando una diferencia de potencial eléctrico a través de un tubo de grafito dentro del cual ha sido colocada la muestra. Se mide la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente.

i. Arsénico

Método: Espectrofotometría de Absorción Atómica con generador de hidruros –vapor frío.⁶²

Fundamento: En un sistema generador de hidruros metálico se genera un flujo continuo de vapor desde el seno donde se halla el

analito, donde la energía absorbida desde su estado fundamental hasta su estado excitado emite energía cuantitativamente idéntica a su energía de excitación, emitiendo radiaciones a longitudes de onda determinada.

3.3.7.3. Estabilidad del colorante obtenido en condiciones óptimas

Se realizaron ensayos de estabilidad del colorante obtenido teniendo en cuenta variaciones de pH y temperatura, como factores que afectan a las xantonas como la mangiferina. Se realizó ensayos al extracto alcohólico al 20% de muestra (p/V).

Para cada temperatura, se incorporó el colorante en medios de diferente pH y cada uno de ellos en diferente temperatura; realizándose un total de 3 ensayos a temperatura ambiente y 3 ensayos en refrigeración (2°C-8°C).

Tabla 18. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Temperatura	pH
Ambiente (22°C)	4
	6
	8
Refrigeración (2°C-8°C)	4
	6
	8

3.3.8. APLICACIÓN DEL COLORANTE EN GELATINA

Se realizó un ensayo de aplicación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) en gelatina para lo cual se preparó la gelatina incorporando el colorante en proporciones de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30%. Se evaluaron las características organolépticas: color, olor, sabor y aspecto durante 5 días y las características fisicoquímicas: pH, °Brix y acidez; el día 1, 3 y 5.

4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de la muestra de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Tabla 19. Rendimiento de la muestra de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango)

Parámetros	Valores	%
Peso de fruta	171,7 g	100,0
Peso de la pulpa	63,0 g	36,7
Volumen de extracto concentrado	42,3 g	24,6
Colorante obtenido (49,0921 µg/µL)	15,1 g	8,8

4.2. Análisis Fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Tabla 20. Análisis Fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Metabolito	Reactivo	Resultado
Carbohidratos (azúcares)	R. Molish	+
Carbohidratos (azúcares)	R. Antrona	+
Carbohidratos (azúcares reductores)	R. Fehling	+
Glicósidos	R. Vainillin sulfúrico	+
Flavonoides	R. Shinoda	+
Fenoles	FeCl ₃ 5%	+
Alcaloides	R. Dragendorff	+
Alcaloides	R. Sonenheim	+
Saponinas	Prueba de espuma	-
Grupos amino libres	R. Ninhidrina	+
Naftoquinonas y antraquinonas	R. Bortranger	+

+ Presente, (-) Ausente.

4.3. Cromatografía de capa fina (CCF)

Tabla 21. Cromatografía de capa fina (CCF) de la muestra de la pulpa del fruto *Mangifera indica* L. (mango).

Cromatografía	
Fase móvil	Metanol
Fase estacionaria	Silica gel G60 F254
Revelador	Luz UV-visible
Rf estándar	0,36
Rf muestra	0,35

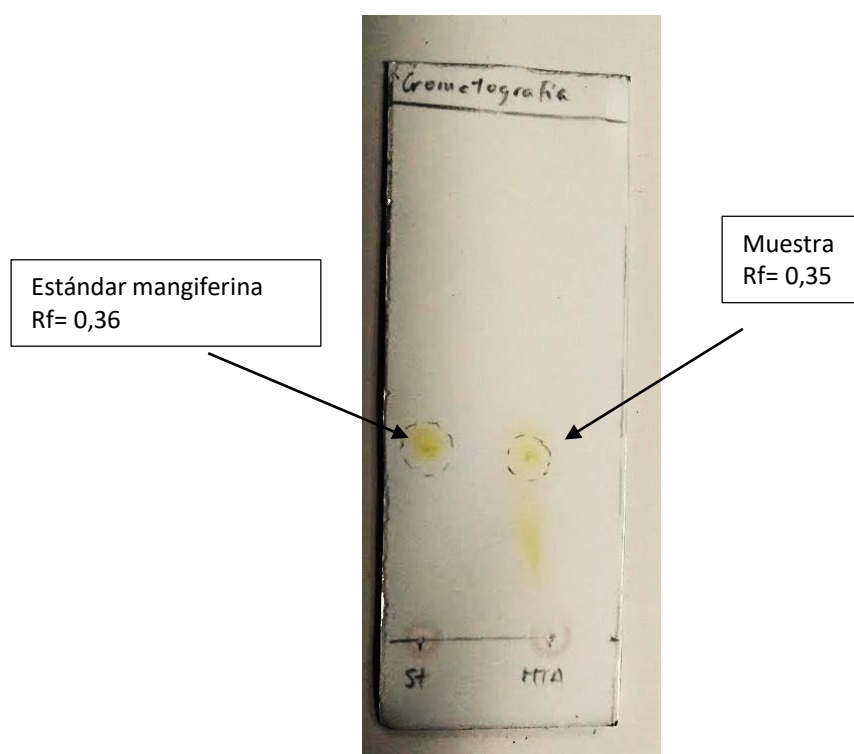


Figura 6. Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de la muestra de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

4.4. Evaluación Químico Bromatológica de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Tabla 22. Composición Químico Bromatológico de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

DESCRIPCIÓN	MANGO
	Muestra fresca
Agua (%)	78,80 %
Proteínas totales (%)	0,36
Grasas (%)	0,02
Carbohidratos (%)	20,02
ARD (% glucosa)**	0,96
ART (% glucosa)***	1,58
Fibra cruda (%)	0,57
Cenizas (%)	0,79
Vitamina C	31,67
Acidez titulable*	0,25
° Brix	18,8
pH	4,34

*Acidez expresado en ácido cítrico, ** A.R.D: Azúcares reductores directos, *** A.R.T: Azúcares reductores totales.

4.5. Pruebas Preliminares para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango)

Los resultados de la evaluación organoléptica se muestran en la tabla 46.

Tabla 23. Evaluación Organoléptica de las pruebas preliminares para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango)

Factor	Ensayo	Aspecto	Color Amarillo
Solvente	Agua	Homogéneo	+
	Etanol 96°	Homogéneo	++++
	Agua: etanol (1:1)	Homogéneo	++
T °C	22	Homogéneo	++++
	40	Homogéneo	+++
	80	Homogéneo	++
M/S (%)	10	Homogéneo	+++
	20	Homogéneo	++++
	30	Homogéneo	++++
	40	Homogéneo	++
	50	Homogéneo	++
pH	2	Homogéneo	++
	4	Homogéneo	++
	6	Homogéneo	++
	8	Homogéneo	++++
	10	Homogéneo	++++
	12	Turbio	++
t (h)	1	Homogéneo	++
	2	Homogéneo	++++
	4	Homogéneo	++++
	6	Homogéneo	++++
	12	Homogéneo	++++
	24	Homogéneo	++++

++++ Intenso, +++ Moderado, ++ Leve, + Muy leve.

T °C: Temperatura en grados centígrados.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

i. Selección del solvente

El colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. fue extraído usando como solventes: etanol 96°, agua destilada y etanol 96°: agua destilada (1:1). La determinación de la concentración del colorante se realizó por el método espectrofotométrico.

Tabla 24. Selección de solvente en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Solvente	Concentración del colorante (μg mangiferina/ μL de extracto) *
Agua destilada	$13,8005 \pm 0,4173$
Etanol 96°	$35,7557 \pm 0,9951$
Agua destilada: etanol (1:1)	$15,2183 \pm 0,3618$

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Los resultados obtenidos de la prueba fueron sometidos y cumplieron pruebas de supuesto de normalidad y homocedasticidad, por lo que fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA). De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA, en la tabla 25, el valor de P es menor a 0,05, permitiendo afirmar que existe una diferencia estadísticamente significativa según a la composición del solvente en la extracción del colorante con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 25. Tabla ANOVA de la comparación del solvente en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	905,826	2	452,913	1048,99	0,0000
Intra grupos	2,59056	6	0,43176		
Total (Corridas)	908,416	8			

Gl: Grado de libertad.

En Figura 7, se observa que etanol 96° presenta una mayor concentración del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) con respecto a los demás solventes por lo que se procede a seleccionar como solvente el etanol 96° para las posteriores extracciones.

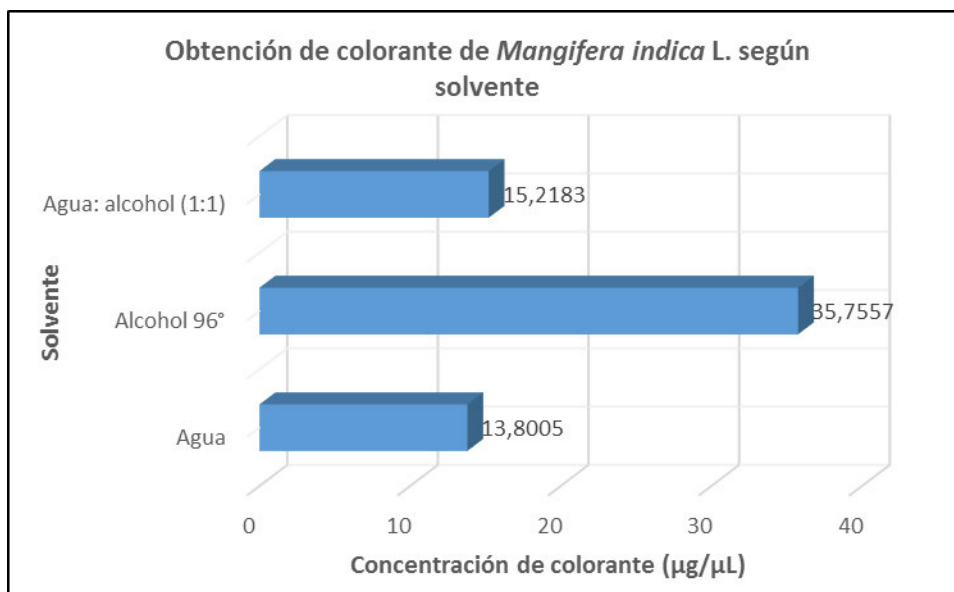


Figura 7. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. según la composición del solvente.

ii. Selección de temperatura

La obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) se realizó a diferentes temperaturas y usando etanol 96° como solvente, que fue evaluado previamente. Los resultados obtenidos de la cuantificación del colorante, por método espectrofotométrico, se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Tratamiento a diferentes temperaturas en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Temperatura (°C)	Concentración del colorante (µg mangiferina/µL de extracto)*
22	38,6099 ± 0,3351
40	35,1812 ± 0,3646
80	32,7904 ± 0,3096

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

De acuerdo al análisis mediante ANOVA (Tabla 27), puesto que el valor de P es menor a 0,05, se afirma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 27. Tabla ANOVA para comparación de las temperaturas de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	51,3379	2	25,6689	225,77	0,0000
Intra grupos	0,68216	6	0,113693		
Total (Corridas)	52,02	8			

Gl: Grado de libertad.

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En la Figura 8, observamos que según incrementa la temperatura, se evidencia un decrecimiento en la cantidad extraída del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., percibiéndose la mayor obtención a la temperatura ambiente (22°C). Por lo tanto, se elige la temperatura de 22 °C como parámetro de extracción.

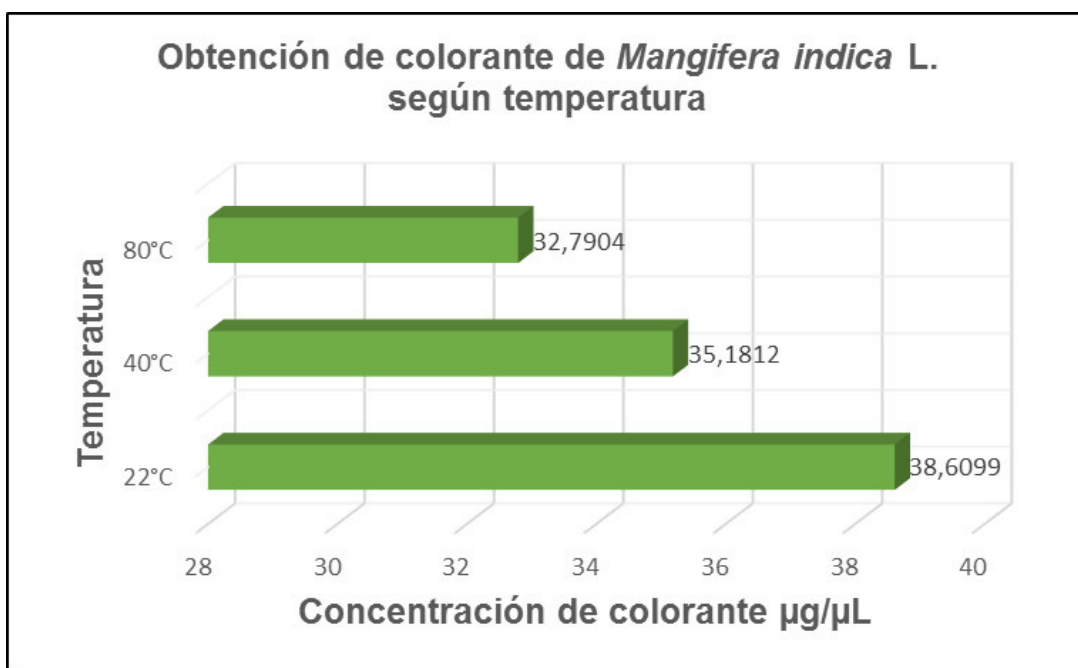


Figura 8. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. según la temperatura.

iii. Selección de relación entre muestra y solvente

Se realizó la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) a diferentes proporciones de muestra respecto al solvente, etanol 96°, y a temperatura ambiente (22°C), ambos parámetros evaluados previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Relación entre muestra y solvente utilizados en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

M/S (%)	Concentración del colorante (μg mangiferina/ μL de extracto)*
10	36,4971 \pm 0,2798
20	38,2763 \pm 0,1399
30	34,5325 \pm 0,2247
40	34,4399 \pm 0,1953
50	34,3101 \pm 0,1399

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

Debido a que según el análisis ANOVA en la tabla 29, el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de concentración entre un nivel de relación entre muestra y solvente y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 29. Tabla ANOVA para comparación de la relación entre muestra y solvente utilizados de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	36,347	4	9,08674	220,46	0,0000
Intra grupos	0,412181	10	0,0412181		
Total (Corridas)	36,7592	14			

Gl: Grado de libertad.

Se procedió a realizar un análisis de comparación múltiple mediante el test de Tukey (HSD), para evidenciar mejor las diferencias existentes debidas a la relación entre muestra y solvente en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. Los resultados se observan en la tabla 31.

Tabla 30. Comparación de grupos homogéneos según Test de Tukey.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD			
M/S (%)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
50%	3	34,3101	X
40%	3	34,4399	X
30%	3	34,5325	X
10%	3	36,4971	X
20%	3	38,2763	X

HSD: Diferencia honestamente significativa, M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

Tabla 31. Comparaciones múltiples test de Tukey (HSD) para diferente relación entre muestra y solvente en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10% - 20%	*	-1,7792	0,545601
10% - 30%	*	1,96453	0,545601
10% - 40%	*	2,0572	0,545601
10% - 50%	*	2,18693	0,545601
20% - 30%	*	3,74373	0,545601
20% - 40%	*	3,8364	0,545601
20% - 50%	*	3,96613	0,545601
30% - 40%		0,0926667	0,545601
30% - 50%		0,2224	0,545601
40% - 50%		0,129733	0,545601

* Indica una diferencia significativa.

En la figura 9, se observa que luego de superar una relación entre muestra y solvente de 20%, la concentración del colorante obtenido disminuye. Se selecciona la relación entre muestra y solvente de 20% como parámetro para las siguientes pruebas.

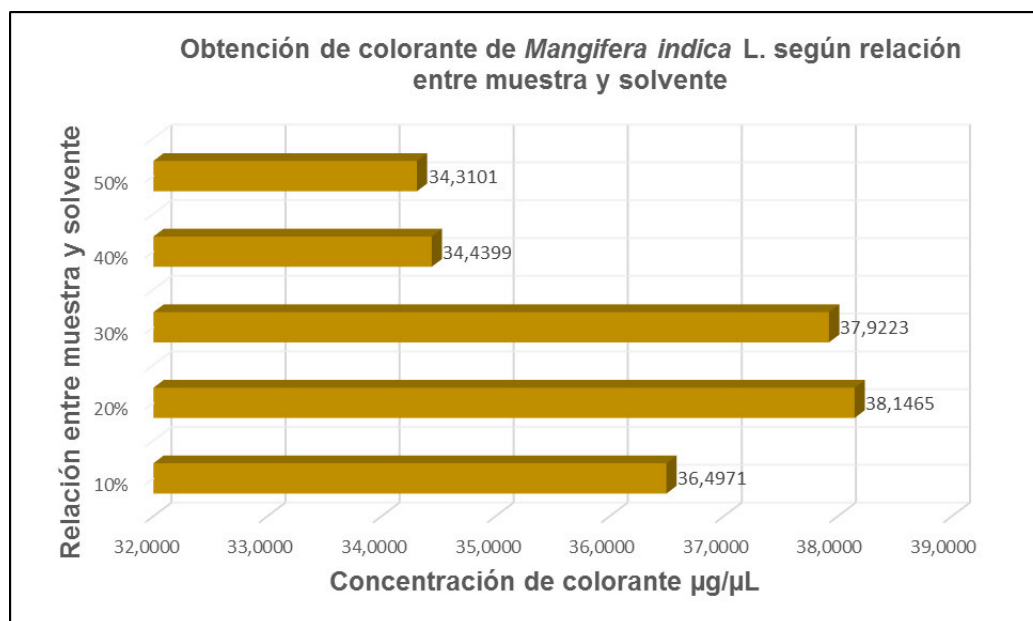


Figura 9. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. según la relación entre muestra y solvente.

iv. Selección de pH

Se obtuvo colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) teniendo en cuenta los parámetros previamente seleccionados como: solvente etanol 96°, temperatura ambiente de extracción (22°C) y relación entre muestra y solvente de 20%; para estudiar el pH requerido para la extracción. Se aprecian los resultados obtenidos en la tabla 32.

Tabla 32. Condiciones de pH utilizadas en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

pH	Concentración del colorante (µg mangiferina/µL de extracto)*
2	34,5333 ± 0,0577
4	34,4667 ± 0,2517
6	35,4000 ± 0,1000
8	36,8667 ± 0,1528
10	37,9000 ± 0,1732
12	35,3000 ± 0,1000

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En el análisis estadístico mediante ANOVA, puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de concentración entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 33. Tabla ANOVA para comparación de los pH de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27,9644	5	5,59289	239,70	0,0000
Intra grupos	0,28	12	0,0233333		
Total (Corridas)	28,2444	17			

Gl: Grado de libertad.

Observamos en la gráfica (figura 10) de comparación, que según incrementa el pH, se evidencia un aumento en la cantidad extraída del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., a diferencia del pH 12 en que se aprecia una considerable disminución además de una notable turbidez del extracto. Por lo tanto, se elige el pH 10 como parámetro de extracción.

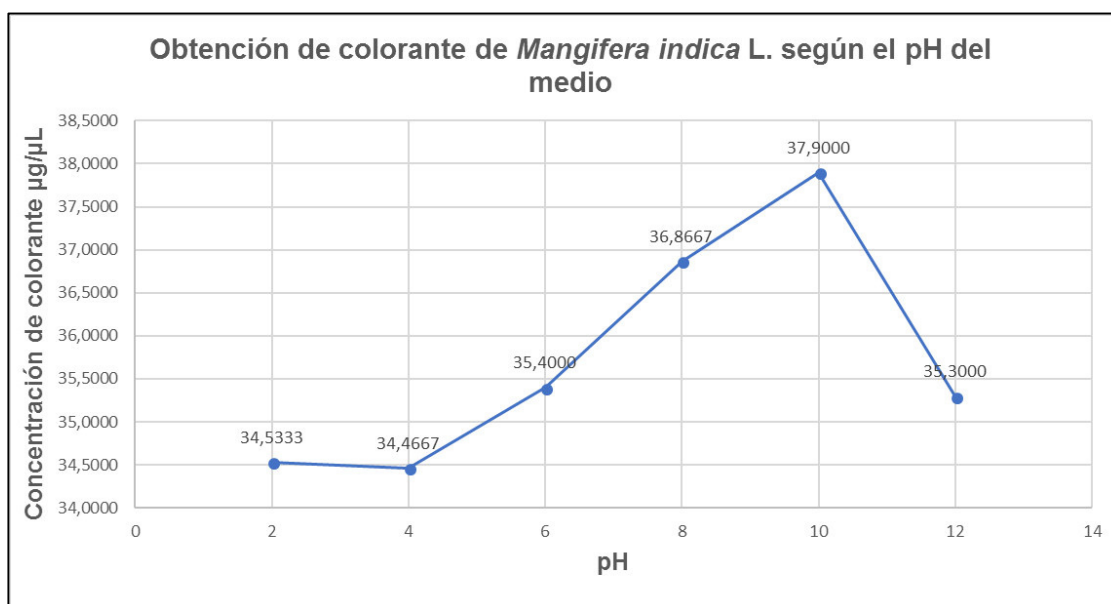


Figura 10. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. según el pH del medio de extracción.

v. Selección del tiempo

El colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango), se extrajo considerando los parámetros previamente seleccionados como etanol 96°, pH de 10, temperatura ambiente de extracción (22 °C) y relación entre muestra y solvente 20%. La cuantificación del colorante se realizó por el método espectrofotométrico. En la Tabla 34 se muestran los resultados.

Tabla 34. Tiempos de extracción en la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

tiempo (horas)	Concentración del colorante (μg mangiferina/ μL de extracto)*
1	$36,8677 \pm 0,1157$
2	$37,9427 \pm 0,1157$
4	$37,8685 \pm 0,0849$
6	$37,9056 \pm 0,0556$
12	$37,8685 \pm 0,0321$
24	$37,9241 \pm 0,0321$

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar

Según el análisis estadístico de las medias mediante ANOVA en la tabla 35, el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, que indica una diferencia estadísticamente significativa entre un nivel de tiempo y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 35. Tabla ANOVA para comparación de los tiempos de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,68691	5	0,537381	82,34	0,0000
Intra grupos	0,0783145	12	0,0065262		
Total (Corridas)	2,76522	17			

Gl: grado de libertad

Se procedió a realizar un análisis de comparación múltiple mediante el test de Tukey (HSD), para evidenciar mejor las diferencias existentes debidas a la relación entre muestra y solvente en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. Los resultados se observan en la Tabla 37.

Tabla 36. Comparación de grupos homogéneos según Test de Tukey.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD			
<i>tiempos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1h	3	36,8677	X
4h	3	37,8685	X
12h	3	37,8685	X
6h	3	37,9056	X
24h	3	37,9241	X
2h	3	37,9427	X

HSD: Diferencia honestamente significativa
h: horas.

Tabla 37. Comparaciones múltiples test de Tukey (HSD) para diferentes tiempos en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
12h - 1h	*	1,0008	0,221586
12h - 24h		-0,0556	0,221586
12h - 2h		-0,0741333	0,221586
12h - 4h		0	0,221586
12h - 6h		-0,0370667	0,221586
1h - 24h	*	-1,0564	0,221586
1h - 2h	*	-1,07493	0,221586
1h - 4h	*	-1,0008	0,221586
1h - 6h	*	-1,03787	0,221586
24h - 2h		-0,0185333	0,221586

* Indica una diferencia significativa
h: horas.

En la figura 11, podemos observar que luego de 2 horas de proceso de extracción no hay cambios significativos en la obtención del colorante.

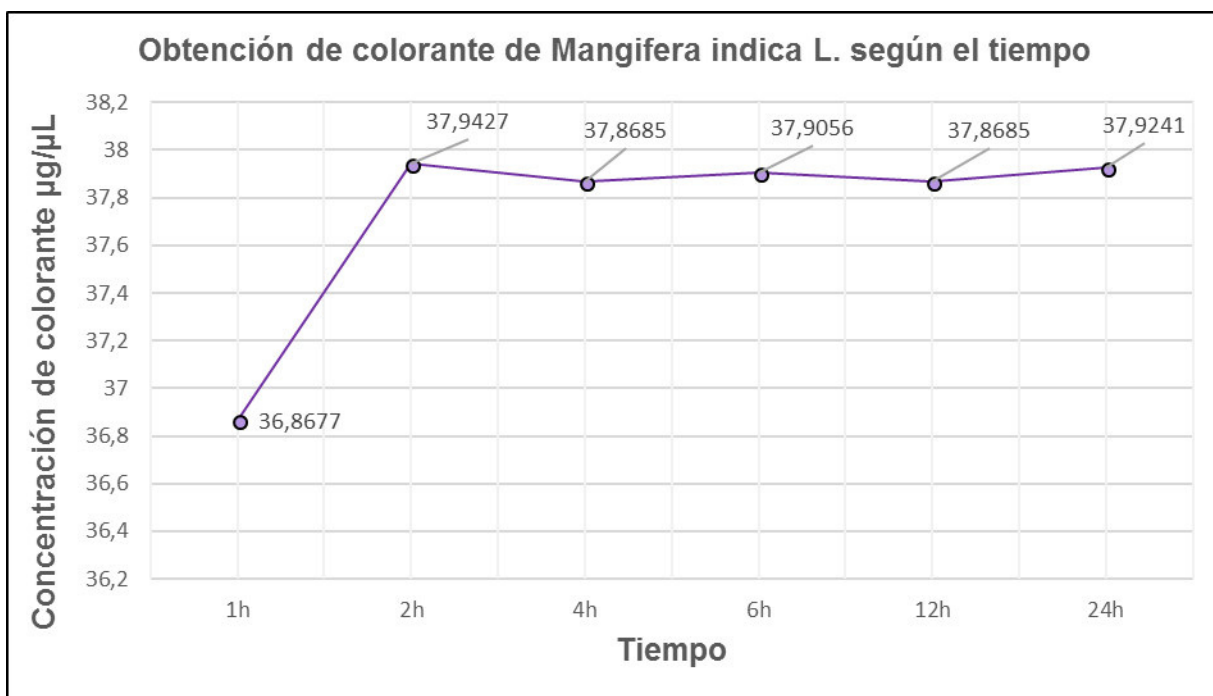


Figura 11. Comparación de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. según el tiempo de tratamiento.

4.6. Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L.

Para la segunda etapa, los ensayos realizados fueron evaluados organolépticamente, obteniendo los resultados de la tabla 38.

Tabla 38. Evaluación Organoléptica de los ensayos del diseño factorial completo general para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Ensayo	M/S (%)	Ph	t (h)	Aspecto	Color Amarillo
1	30	8	1	Homogéneo	+++
2	20	10	4	Homogéneo	++++
3	10	10	4	Homogéneo	+++
4	30	8	4	Homogéneo	+++
5	10	8	1	Homogéneo	+++
6	20	8	2	Homogéneo	+++
7	30	9	2	Homogéneo	+++
8	10	8	4	Homogéneo	+++
9	30	10	2	Homogéneo	++++
10	10	10	1	Homogéneo	+++
11	10	9	4	Homogéneo	++++
12	20	9	4	Homogéneo	++++
13	20	10	1	Homogéneo	++++
14	10	9	2	Homogéneo	++++
15	20	10	2	Homogéneo	++++
16	20	8	1	Homogéneo	+++
17	30	10	4	Homogéneo	++++
18	20	9	2	Homogéneo	++++
19	30	9	1	Homogéneo	+++
20	30	10	1	Homogéneo	+++
21	20	9	1	Homogéneo	++++
22	10	9	1	Homogéneo	++++
23	10	8	2	Homogéneo	+++
24	30	9	4	Homogéneo	++++
25	30	8	2	Homogéneo	+++
26	20	8	4	Homogéneo	+++
27	10	10	2	Homogéneo	++++

++++ Intenso, +++ Moderado, ++ Leve, + muy leve.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

Los resultados para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenidos según el diseño factorial completo general se presentan en la Tabla 39.

Tabla 39. Concentraciones del colorante obtenido con el Diseño Factorial Completo General.

Diseño Factorial				Resultado experimental*
Orden Corrida	M/S (%)	pH	t (h)	Concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	30	8	1	31,2268
2	20	10	4	43,2920
3	10	10	4	41,1236
4	30	8	4	31,9774
5	10	8	1	33,1172
6	20	8	2	38,6216
7	30	9	2	40,4564
8	10	8	4	34,5350
9	30	10	2	41,0124
10	10	10	1	38,8718
11	10	9	4	42,7360
12	20	9	4	44,7098
13	20	10	1	41,8742
14	10	9	2	44,1538
15	20	10	2	46,0442
16	20	8	1	35,8972
17	30	10	4	43,3754
18	20	9	2	48,5462
19	30	9	1	40,4564
20	30	10	1	38,8718
21	20	9	1	45,2380
22	10	9	1	42,3190
23	10	8	2	35,0354
24	30	9	4	41,3738
25	30	8	2	31,1990
26	20	8	4	34,9520
27	10	10	2	41,8464

*Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones.
M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.
t (h): Tiempo en horas.

De la tabla 39, observamos que, se obtuvo una mayor concentración del colorante a una relación entre muestra y solvente de 20%, pH9 y tiempo de 2 horas (ensayo 18). En cambio, la relación entre muestra y solvente de 30%, pH 8 y tiempo de 2 horas (ensayo 25) obtuvo la menor concentración del colorante.

Se realizó el análisis estadístico ANOVA a los resultados experimentales, los cuales se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Análisis de varianza del Diseño Factorial Completo General para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Fuente	Gl	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	18	587,303	32,628	201,27	0,000
Lineal	6	553,077	92,180	568,62	0,000
M/S (%)	2	87,994	43,997	271,40	0,000
pH	2	444,902	222,451	1372,22	0,000
t (h)	2	20,181	10,090	62,24	0,000
Interacciones de 2 términos	12	34,225	2,852	17,59	0,000
M/S (%) * pH	4	11,060	2,765	17,06	0,001
M/S (%) * t (h)	4	17,296	4,324	26,67	0,000
pH * t (h)	4	5,870	1,467	9,05	0,005
Error	8	1,297	0,162		
Total	26	588,599			
Resumen del modelo	S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	R-cuadrado (predictivo)	
	0,402629	99,78%	99,28%	99,49%	

Gl: Grado de libertad, SC Ajust.: Sumas ajustadas de los cuadrados, MC Ajust.: Cuadrados medios ajustados.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

A partir del análisis ANOVA realizado, observamos que los factores empleados en la obtención del colorante como: relación M/S (%) ($p= 0,000$), pH ($p= 0,000$) y tiempo ($p= 0,000$) son significantes. Mientras que, en cuanto a las interacciones entre factores, la interacción “M/S (%) * t (h)” es la que más afecta la obtención del colorante ($p= 0,000$); seguida de las interacciones “M/S (%) * pH” ($p= 0,001$) y “pH * t (h)” ($p= 0,005$) respectivamente.

El coeficiente de determinación R^2 cuadrado indicó que de variabilidad en la respuesta puede ser explicado en un 99,78% por el diseño factorial, por lo que solo un 0,22% de la variación no fue explicado por el diseño.

La gráfica de Pareto nos muestra la influencia de los factores significativos para la obtención del colorante. La línea vertical (2.31) corresponde al 99% de límite de confianza, indicando que hay significancia estadística respecto a la respuesta deseada.

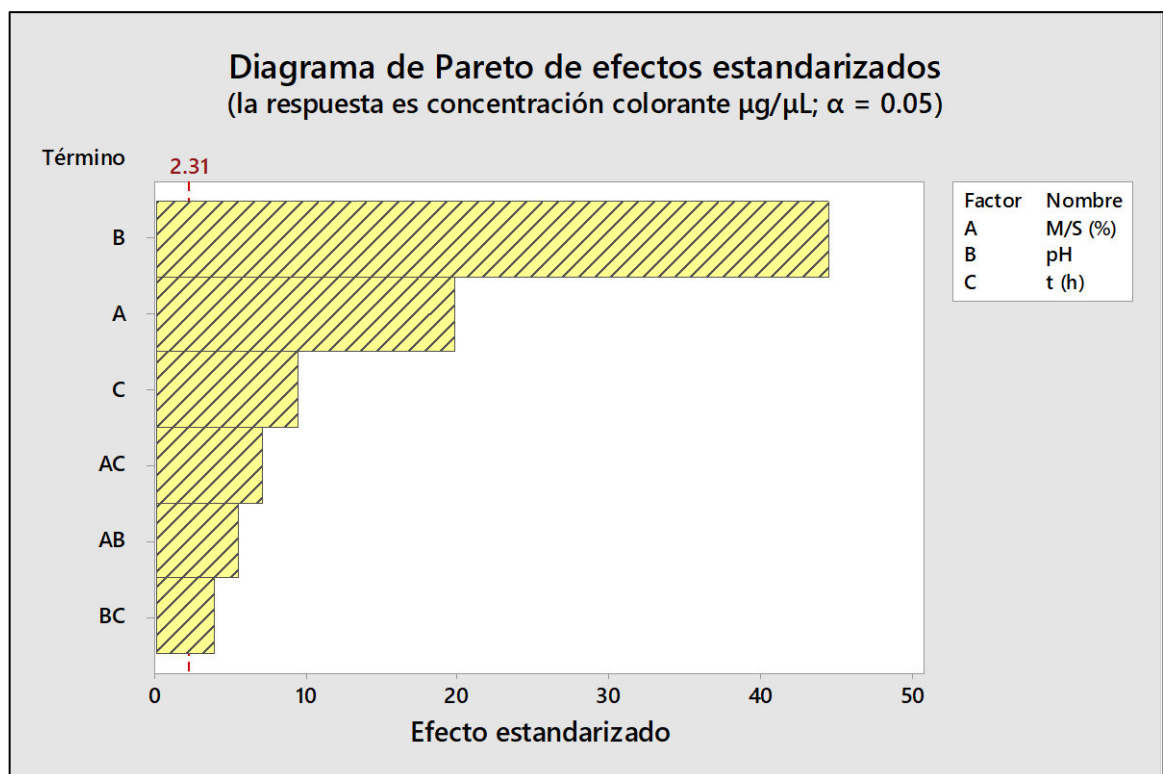


Figura 12. Diagrama Pareto de efectos estandarizados para Concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La longitud de cada barra, es proporcional al valor absoluto del efecto estandarizado, por lo tanto, lo observado en la figura 12, guarda congruencia con los resultados del análisis ANOVA.

La Figura 12, corrobora entonces, que los tres factores analizados son relevantes en la obtención del colorante, siendo el orden de influencia de mayor a menor: relación M/S (%), pH y tiempo, respectivamente.

Empleando la gráfica de efectos principales, se observó que a un nivel intermedio de la relación M/S (%) 20%, nivel medio de pH (9,0) y tiempo de 2 horas hay una mayor obtención del colorante (Figura 13).

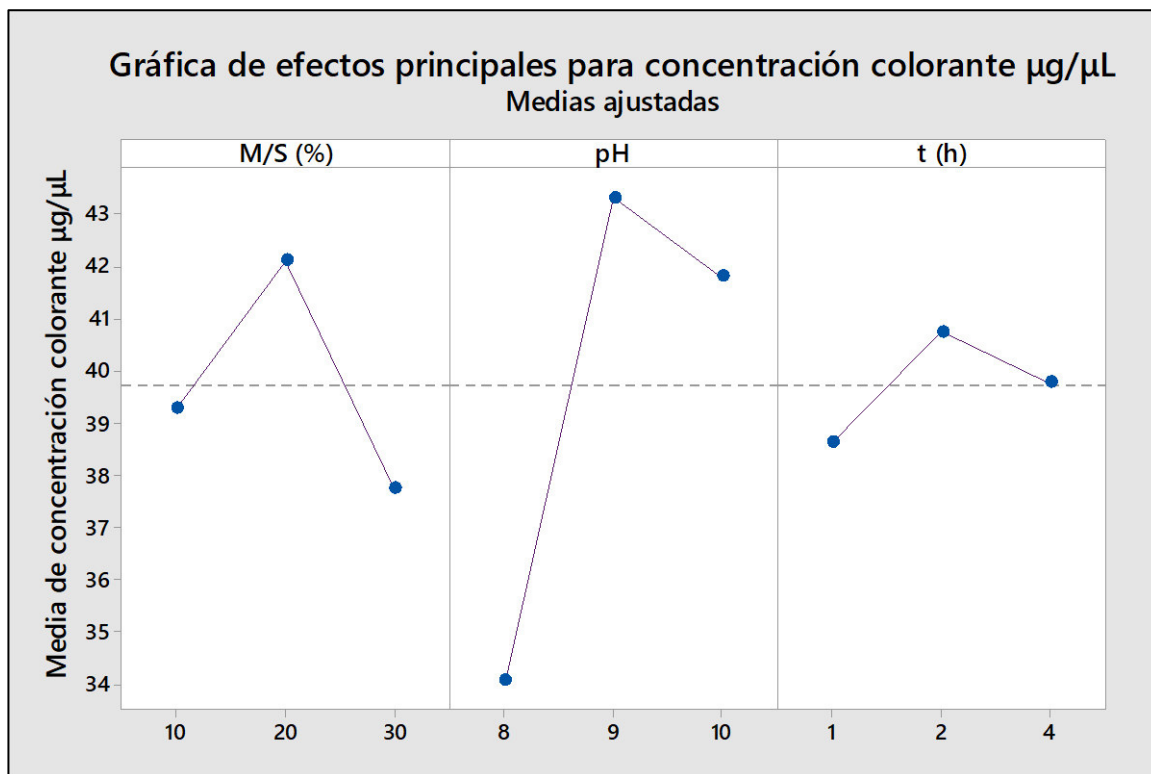


Figura 13. Grafica de efectos principales para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Debido a la observación que, a un nivel medio de relación M/S (%), resulta mayor la obtención del colorante, el nivel central se mantendrá como tal para el diseño Box Behnken acortando solo el nivel inferior y superior, para el caso del factor pH, se acortaron los niveles usando como límites el pH 8,5 y 9,5; y en el caso del factor tiempo se acortaran los niveles haciéndolos más cercanos al nivel medio que fue donde se observa la mejor obtención del colorante.

De acuerdo al análisis del diseño factorial, podemos evaluar las interacciones de los factores y su influencia en la variable respuesta. En la Figura 14 las interacciones entre “M/S (%) *pH”, “M/S (%) *t (h)”, “pH* t (h)” indican cuáles

son los niveles de estos factores en cada interacción donde hubo mayor obtención del colorante.

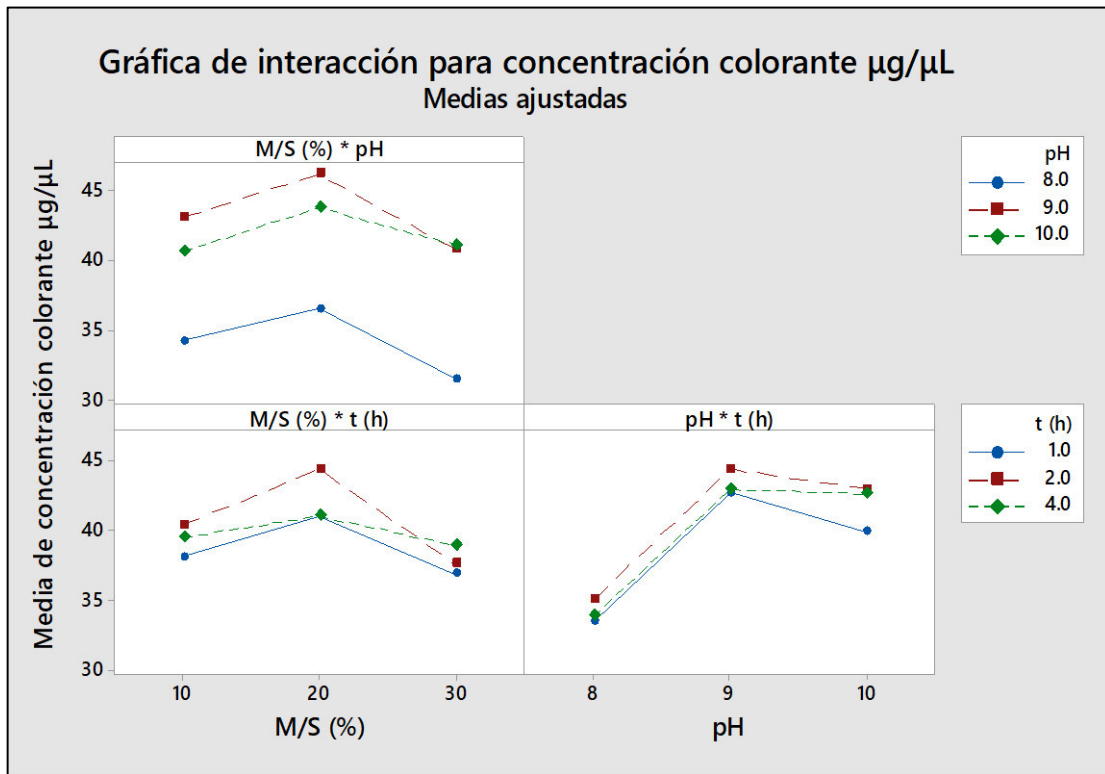


Figura 14. Interacción entre factores del Diseño Factorial Completo General.

4.7. Diseño Box Behnken

La última etapa consistió en la realización de ensayos siguiendo el diseño matriz de la Tabla 15.

Los resultados de la evaluación organoléptica se muestran en la tabla 41.

Tabla 41. Evaluación Organoléptica de los ensayos del diseño Box Behnken para la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Ensayo	M/S (%)	pH	t (h)	Aspecto	Color Amarillo
1	22	8,5	2	Homogéneo	++++
2	18	9	1,5	Homogéneo	+++
3	20	9	2	Homogéneo	++++
4	20	8,5	2,5	Homogéneo	+++
5	20	8,5	1,5	Homogéneo	++++
6	20	9,5	1,5	Homogéneo	+++
7	18	9	2,5	Homogéneo	++++
8	22	9	1,5	Homogéneo	++++
9	22	9	2,5	Homogéneo	+++
10	18	9,5	2	Homogéneo	+++
11	22	9,5	2	Homogéneo	+++
12	20	9,5	2,5	Homogéneo	+++
13	20	9	2	Homogéneo	++++
14	18	8,5	2	Homogéneo	++
15	20	9	2	Homogéneo	++++

++++ Intenso, +++ Moderado, ++ Leve, + muy leve.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): tiempo en horas.

Los resultados de cuantificación de la concentración del colorante obtenido se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Colorante obtenido de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) mediante la interacción de los parámetros óptimos según el diseño Box Behnken.

Matriz de diseño				Resultados experimentales
Ensayo	M/S (%)	pH	t (h)	Concentración del colorante $\mu\text{g} / \mu\text{L}$
1	22	8,5	2	42,5374
2	18	9	1,5	39,8130
3	20	9	2	48,5978
4	20	8,5	2,5	43,2880
5	20	8,5	1,5	39,9520
6	20	9,5	1,5	42,6208
7	18	9	2,5	44,7614
8	22	9	1,5	44,2610
9	22	9	2,5	45,7344
10	18	9,5	2	41,8424
11	22	9,5	2	46,0402
12	20	9,5	2,5	46,0124
13	20	9	2	48,7090
14	18	8,5	2	39,7574
15	20	9	2	48,7646

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.
t (h): Tiempo en horas.

Se encontró experimentalmente que a una relación M/S de 20%, pH 9,0 y 2 horas; hubo una mayor obtención del colorante (ensayo 15).

Tabla 43. Resumen del diseño Box Behnken.

Factores	3	Replicas	1
Corridas Base	15	Total de Ensayos	15
Bloques Base	1	Total de Bloques	1
Puntos Centrales	3		

Tabla 44. Regresión de superficie de respuesta: concentración del colorante µg/µL vs. M/S (%), pH, t (h).

Término	Coefficiente	Ee de Coeficiente	Valor T	Valor P
Constante	48,690	0,149	326,40	0,000
M/S (%)	1,5498	0,0914	16,97	0,000
pH	1,3726	0,0914	15,03	0,000
t (h)	1,6437	0,0914	17,99	0,000
M/S (%)* M/S (%)	-2,736	0,134	-20,35	0,000
pH*pH	-3,410	0,134	-25,36	0,000
t (h)* t (h)	-2,312	0,134	-17,19	0,000
M/S (%)*pH	0,354	0,129	2,74	0,041
M/S (%)*t (h)	-0,869	0,129	-6,72	0,001
pH* t (h)	0,014	0,129	0,11	0,919
Resumen del modelo	S	R-cuadrado	R- cuadrado (ajustado)	R-cuadrado (predictivo)
	0,258381	99,76%	99,33%	96,29%

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

Ee: Error estándar.

La ecuación de segundo orden simula correctamente la obtención del colorante según el diseño Box Behnken.

Ecuación de regresión en unidades codificadas:

$$Y = -1383,5 + 26,68 X_1 + 241,1 X_2 + 57,15 X_3 - 0,6840 X_1^2 - 13,641 X_2^2 - 9,248 X_3^2 + 0,354 X_1 X_2 - 0,869 X_1 X_3 + 0,056 X_2 X_3$$

Y: Concentración del colorante µg/µL, X1: Relación entre muestra y solvente, X2: pH, X3: tiempo.

Según la tabla 44, el valor mostrado por el coeficiente de determinación R cuadrado nos señaló que un 99,33% de variabilidad en la variable respuesta puede ser dilucidado por el diseño propuesto; por lo tanto, no fue explicada por el diseño sólo un 0,63%.

Tabla 45. Análisis de varianza de los ensayos del diseño Box Behnken.

Fuente	Gl	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	138,188	15,3542	229,99	0,000
Lineal	3	55,902	18,6341	279,12	0,000
M/S (%)	1	19,216	19,2163	287,84	0,000
pH	1	15,073	15,0728	225,77	0,000
t (h)	1	21,613	21,6133	323,74	0,000
Cuadrado	3	78,763	26,2543	393,26	0,000
M/S (%)*M/S (%)	1	27,639	27,6392	414,00	0,000
pH*pH	1	42,938	42,9379	643,16	0,000
t (h)*t (h)	1	19,737	19,7372	295,64	0,000
Interacción de 2 factores	3	3,522	1,1741	17,59	0,004
M/S (%)*pH	1	0,503	0,5025	7,53	0,041
M/S (%)*t (h)	1	3,019	3,0189	45,22	0,001
pH* t (h)	1	0,001	0,0008	0,01	0,919
Error	5	0,334	0,0668		
Falta de ajuste	3	0,319	0,1065	14,76	0,064
Error puro	2	0,014	0,0072		
Total	14	138,521			

Gl: Grado de libertad, SC Ajust.: Sumas ajustadas de los cuadrados, MC Ajust.: Cuadrados medios ajustados.

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t (h): Tiempo en horas.

De lo obtenido por el análisis de varianza (ANOVA) (valor $p = 0$), se comprueba que la ecuación de segundo orden es la que representa mejor la obtención del colorante.

En el diagrama de Pareto, Figura 15, se representan los efectos estandarizados con $p = 0,05$ y se observa que los factores BB y AA son los más significativos. La longitud de las barras corresponde al valor absoluto de los efectos estandarizados.

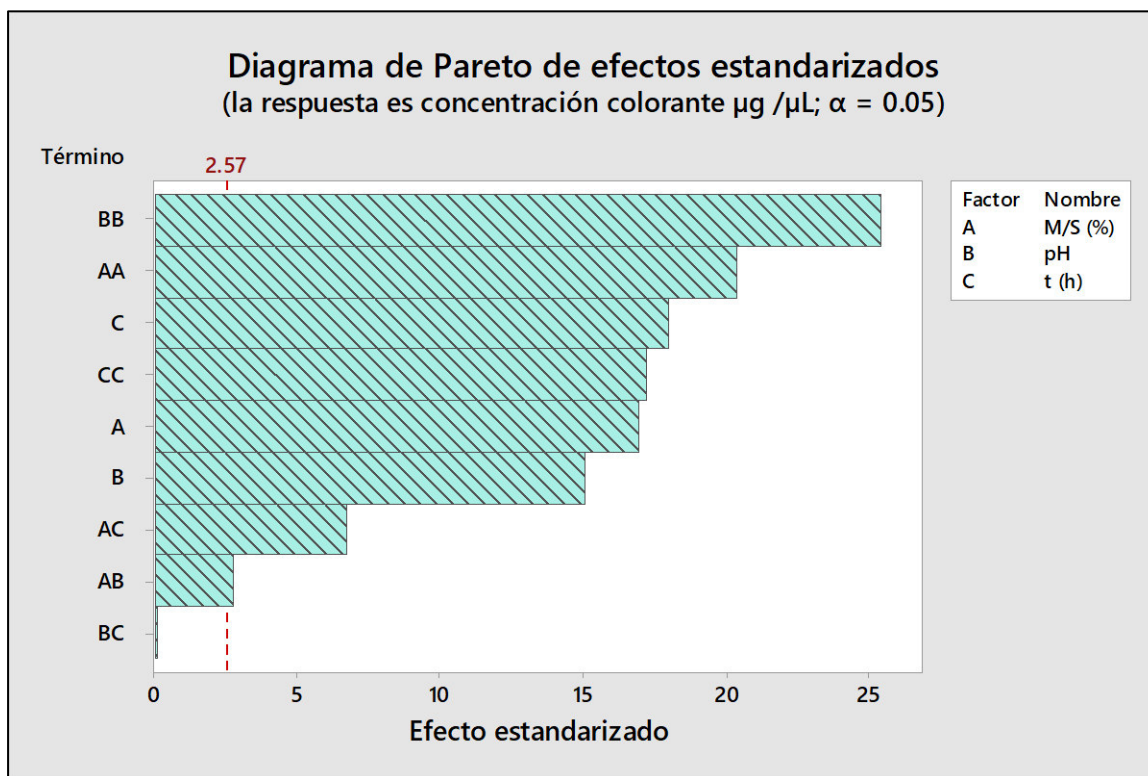


Figura 15. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Lo observado en la figura 15, guarda congruencia con los resultados del análisis ANOVA.

En la Figura 16, se muestra la distribución normal de los valores residuales, definidos como la diferencia entre los valores ajustados (modelo) y los valores observados (experimentales); donde se puede apreciar como los residuos siguen una distribución normal, donde la mitad toma valores positivos ($> 50\%$) y la otra mitad toma valores negativos ($< 50\%$).

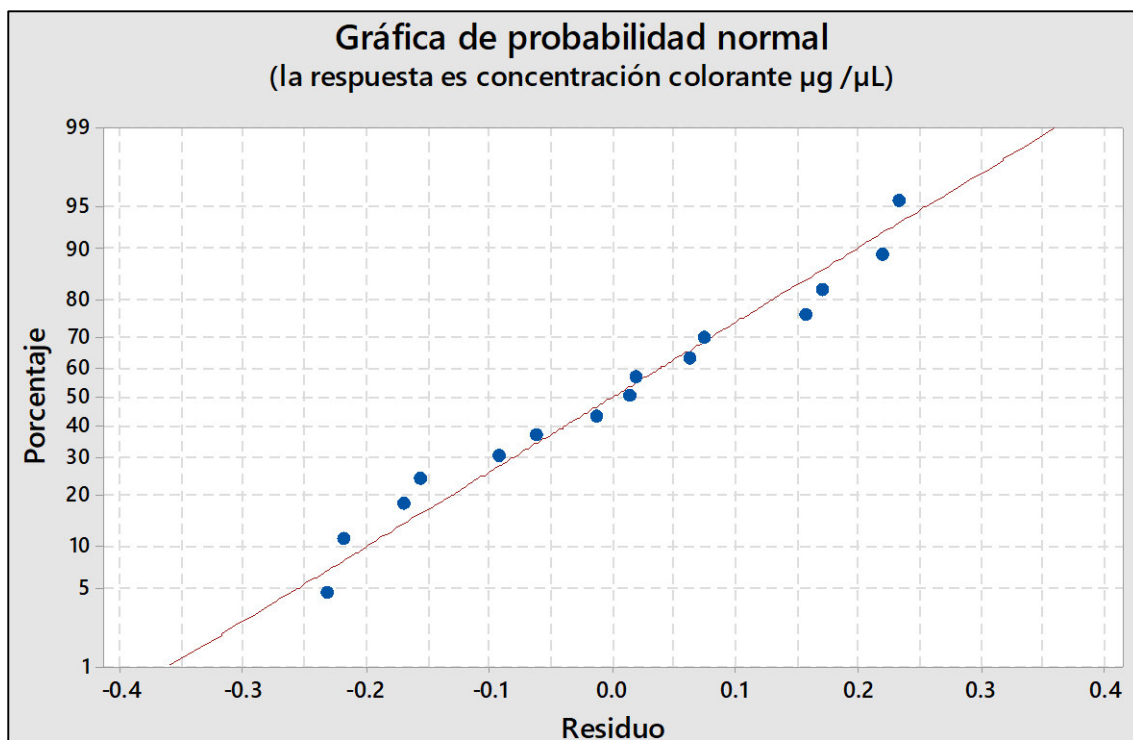


Figura 16. Gráfica de probabilidad normal de residuos para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

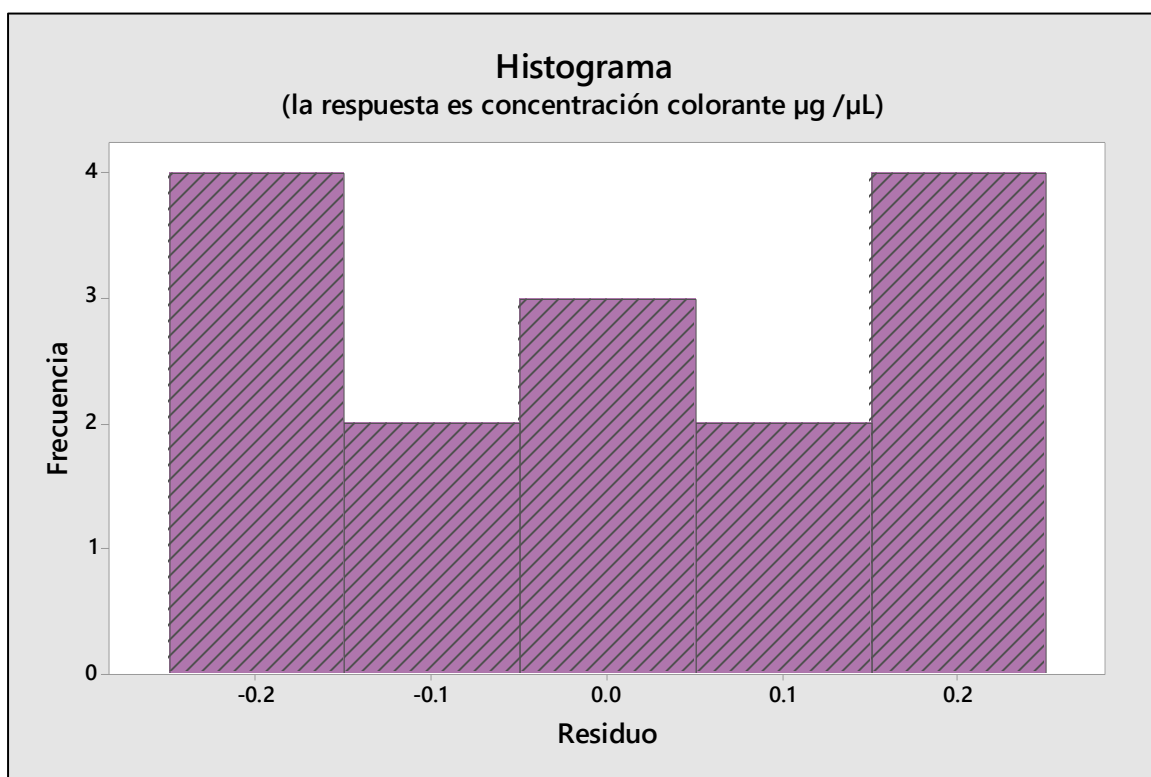


Figura 17. Histograma de residuos para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En la Figura 18 se muestra, que la variable M/S (%) (18-22%), a pesar de tener un efecto positivo, presentó una influencia relativamente menor que la observada por la variable pH (8,5 – 9,5).

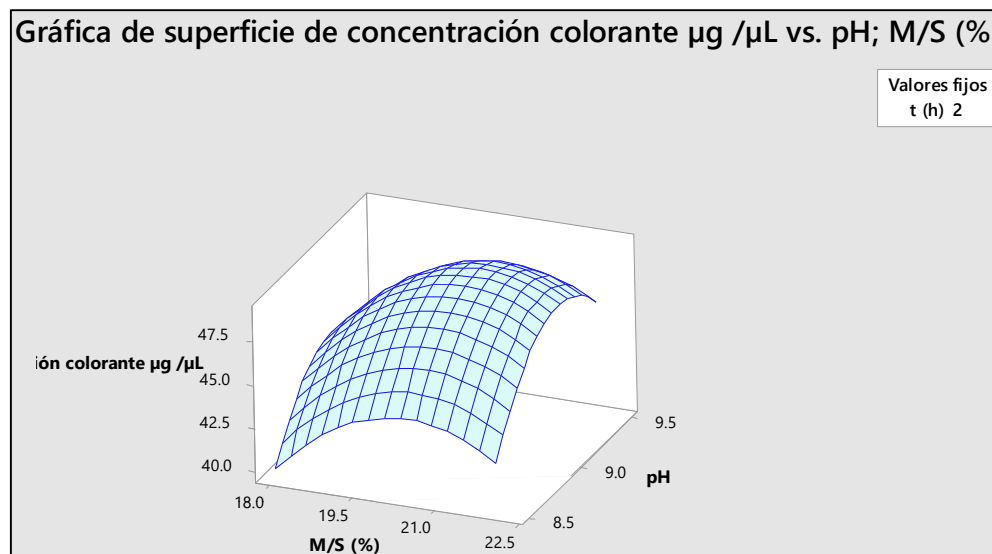


Figura 18. Superficie de respuesta de concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus pH, M/S (%).

De la Figura 19, se observa que la variable M/S (%) (18-22%), a pesar de tener un efecto positivo, presentó una influencia relativamente menor que la observada por la variable tiempo (1,5 – 2,5).

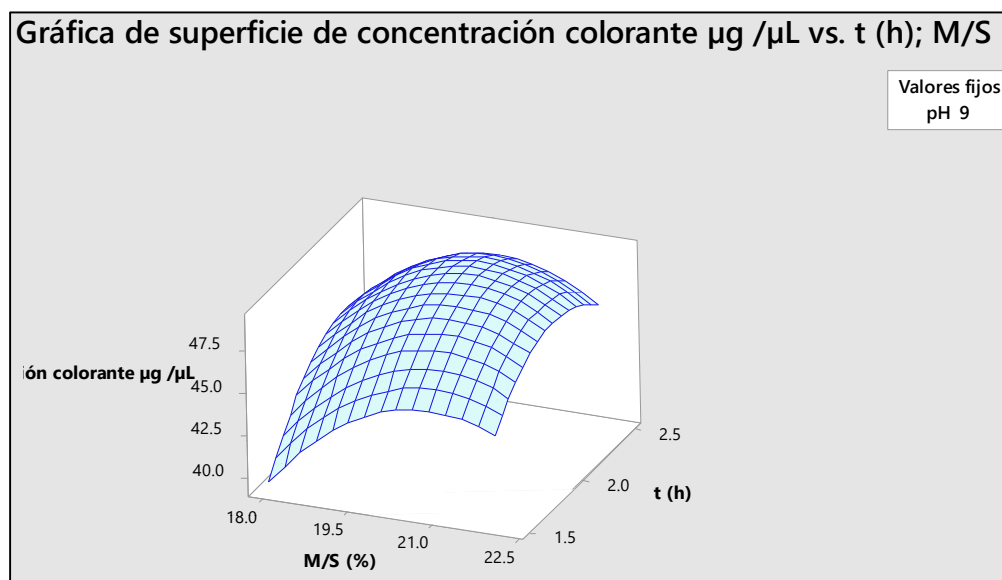


Figura 19. Superficie de respuesta de concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus t (h), M/S (%).

La gráfica de Superficie de respuesta del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ muestra que la variable pH (8,5 – 9,5), a pesar de su efecto positivo, presentó una influencia relativamente menor que la observada por la variable tiempo (1,5 – 2,5).

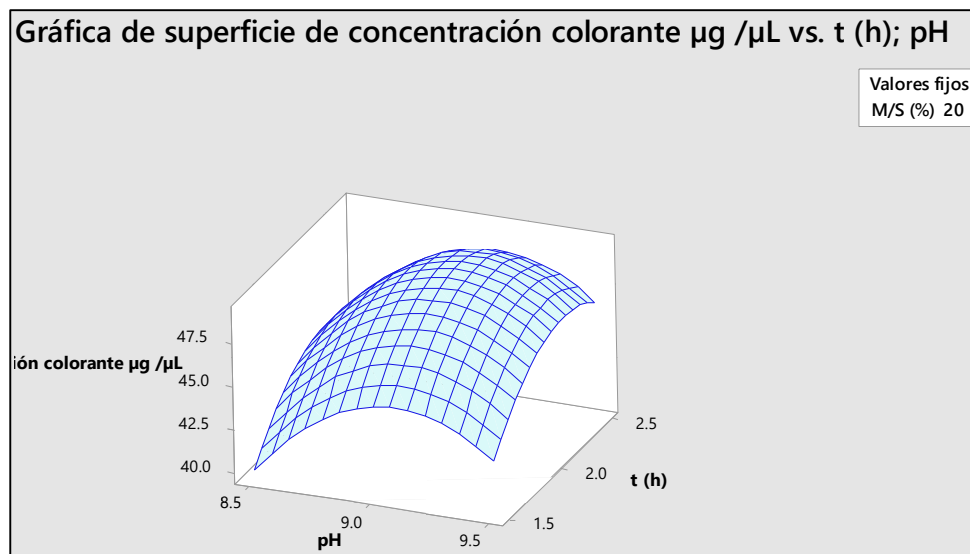


Figura 20. Superficie respuesta de concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus t. (h), pH.

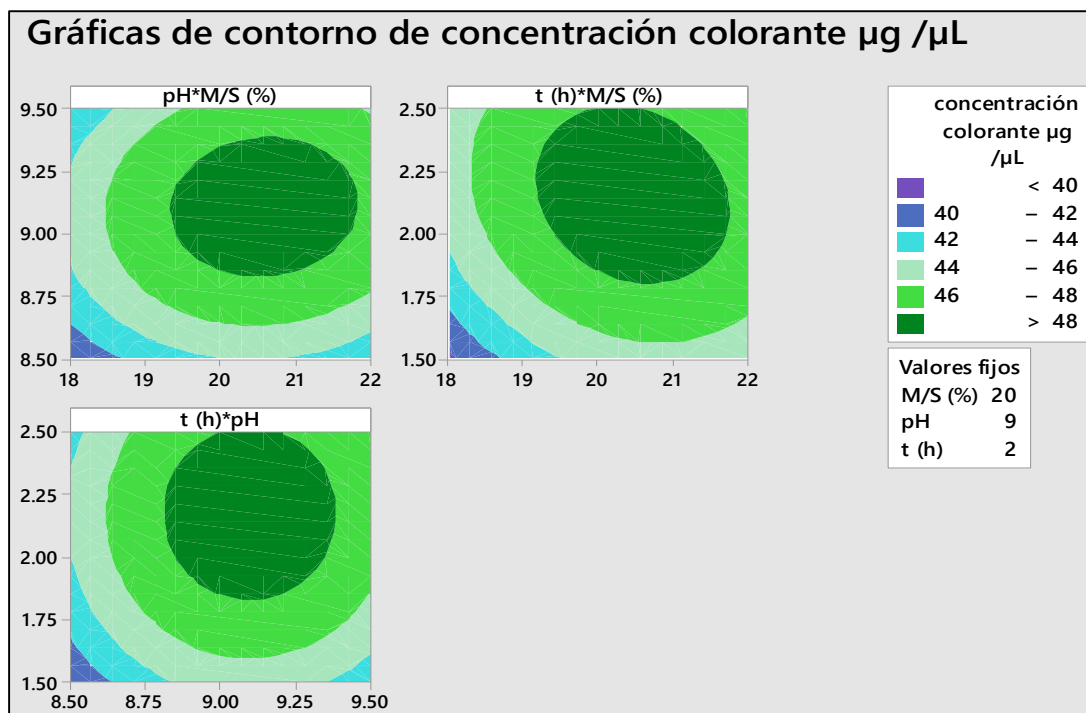


Figura 21. Gráficas de contornos para concentración del colorante $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus M/S (%), pH y t.

Tabla 46. Parámetros de la optimización de respuesta del diseño Box Behnken.

Parámetros						
Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
Concentración colorante	Máximo	39,7574	48,7646	48,7646	1	1
Solución						
Solución	M/S (%)	pH	t (h)			
1	20,5051	9,10606	2,15657			
Respuesta pronosticada						
Respuesta	Ajuste	Ee de ajuste	Deseabilidad compuesta			
Concentración colorante	49,2843	0,141	1			

M/S (%): Relación entre muestra y solvente expresada en porcentaje.

t(h): Tiempo en horas.

Ee: Error estándar.0

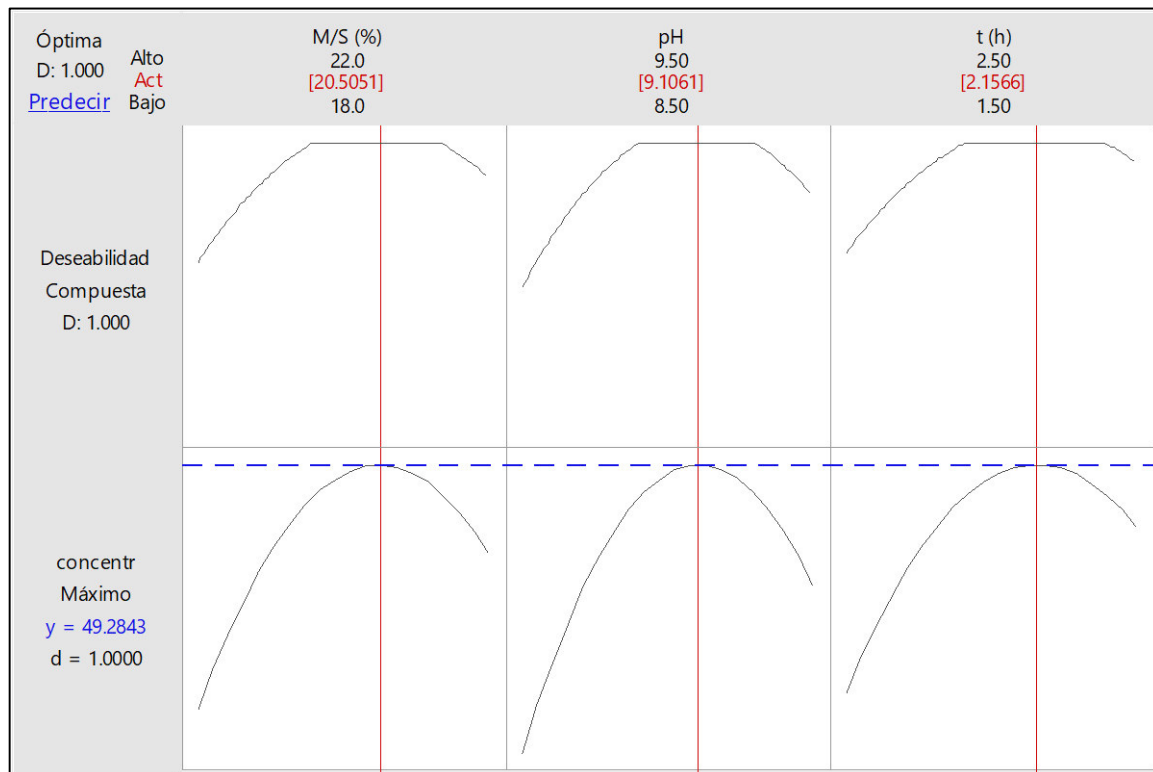


Figura 22. Gráfica de Optimización de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

Según los análisis realizados se determinó que las condiciones óptimas de obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. son M/S 20,5 %, pH 9,1 y un tiempo de 2,16 horas para un resultado teórico de 49,2843 µg/µL; con un valor experimental obtenido de 49,0921 µg/µL.

4.8. Evaluación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido a condiciones óptimas.

Tabla 47. Evaluación Organoléptica del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido a condiciones óptimas.

Características	Resultado
Color	Amarillo
Olor	Característico a mango
Sabor	Dulce
Aspecto	Homogéneo

Tabla 48. Evaluación fisicoquímica del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido a condiciones óptimas.

Descripción	Resultado
Determinación de la materia volátil (%)	7,56
Determinación de la materia insoluble en etanol de 96° (%)	0,17
Determinación de la materia insoluble en agua (%)	0,12
Cloruros* (%)	2,73
Sulfatos** (%)	3,53
Materia extraíble en Éter (%)	0,11
Plomo (mg/kg)	0,196
Arsénico (mg/kg)	0,097

* En forma de cloruro de sodio, **En forma de sulfato de sodio.

Tabla 49. Ensayos de solubilidad del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. obtenido a condiciones óptimas.

Ensayo N°	Solvente	Solubilidad
1	Etanol de 96°	++++
2	Agua destilada	+++
3	Solución alcalina diluida (hidróxido de sodio 0,05 N)	+++
4	Solución acida diluida (ácido clorhídrico 0,05 N)	++
5	Éter	+

++++: Muy soluble, +++: soluble, ++: moderadamente soluble, +: muy poco soluble.

Tabla 50. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango), mediante la lectura de absorbancias a 377 nm (mangiferina).

Extracto etanólico 96° 20% (p/V)											
pH/Día	Temperatura										
	Ambiente (22°C)					Refrigeración (2°C-8°C)					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
	pH4	0,324	0,324	0,314	0,305	0,310	0,261	0,276	0,261	0,263	0,269
	pH6	0,362	0,382	0,394	0,398	0,403	0,292	0,327	0,312	0,318	0,326
pH8	0,384	0,449	0,474	0,465	0,475	0,311	0,335	0,337	0,35	0,365	

Tabla 51. Ensayos de estabilidad a diferentes valores de temperatura y pH para la conservación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) mediante análisis fisicoquímico y organoléptico.

<i>Extracto etanólico 96° 20% (p/V)</i>											
pH	Día	Temperatura									
		Ambiente (22°C)					Refrigeración (2°C-8°C)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pH4	pH	4,36	4,34	4,34	4,29	3,58	4,32	4,32	4,3	4,25	4,1
	° Brix	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21,5
	Acidez	0,87	0,86	0,86	0,87	0,90	1,04	1,04	1,03	1,07	1,10
	Color	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
	Aspecto	homogéneo	homogéneo	turbio	turbio	turbio	homogéneo	homogéneo	turbio	turbio	turbio
pH6	pH	6,10	6,08	6,08	6,01	5,85	5,26	5,25	5,25	5,19	5,1
	° Brix	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21,5
	Acidez	0,8	0,9	0,09	0,09	0,09	0,25	0,25	0,25	0,26	0,27
	Color	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
	Aspecto	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	turbio
pH8	pH	8,30	8,24	8,22	8,03	7,7	8,10	8,07	8,06	7,90	7,85
	° Brix	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21,5
	Acidez	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,05	0,06	0,06
	Color	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
	Aspecto	homogéneo	turbio	turbio	turbio	turbio	homogéneo	turbio	turbio	turbio	turbio

Tabla 52. Ensayos de aplicación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) en gelatina.

Día	Características organolépticas			
	Color	Olor	Sabor	Aspecto
1	Amarillo	Característico a mango	Dulce	Homogéneo
2	Amarillo	Característico a mango	Dulce	Homogéneo
3	Amarillo oscuro	Característico a mango	Dulce	Homogéneo
4	Amarillo oscuro	Característico a mango	Agridulce	Turbio
5	Amarillo oscuro	Característico a mango	Agridulce	Turbio

Tabla 53. Análisis fisicoquímico del ensayo de aplicación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) en gelatina.

Día	Características fisicoquímicas		
	pH	°Brix	Acidez
1	5,38	12	5,38
5	5,12	12	2,5

5. DISCUSIÓN

La muestra de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) dio como resultado de su evaluación químico bromatológica un porcentaje de agua de 78,8 %, menor al señalado en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 83,0 %, y por Encina (2014)⁶⁴ 83,21%, pero similar al reportado por Corrales (2014)⁶⁵ 79,3 %.

En cuanto al contenido de proteínas de la pulpa fresca de *Mangifera indica* L. (mango), experimentalmente se obtuvo valores de 0,36% para proteínas, el mismo que no difiere al descrito en en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 0,4 %, pero fue mayor a los valores reportados por Corrales (2014)⁶⁵ 0,01 % y mayor a Caez (2012)⁶⁶ 0,63%. Respecto a la prueba de determinación de grasas (0,02 %), los resultados fueron menores a lo reportado en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 0,2% y Encina (2014)⁶⁴ 0,53%; por el contrario, no difieren a lo obtenido por Corrales, 2014 (0,02%).⁶⁵

El resultado de la cantidad de carbohidratos totales fue de 20,02 % siendo mayor a lo descrito en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 15,9 % y por Encina (2014)⁶⁴ que reporta un contenido de carbohidratos totales de 14,98 %, en cambio, Corrales (2014)⁶⁵ reporta un contenido de carbohidratos totales similar (20,3 %) y la cantidad de azúcares reductores totales (1,58 %) encontrada fue menor a la encontrada por Arias (2009), 3,35 %.⁶⁷

El contenido de fibra cruda (0,57 %), de la pulpa fresca de *Mangifera indica* L. (mango) fue menor a lo reportado en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 1-1,8% y por el contrario no difieren a lo obtenido por Corrales (2014)⁶⁵ 0,4% y Encina (2014) 0,48%.⁶⁴

El porcentaje de cenizas encontrado en el análisis bromatológico de la pulpa fresca de *Mangifera indica* L. (mango) fue de 0,79 %, siendo mayor a lo descrito en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos (2009)⁶³ 0,5 % y por Encina (2014)⁶⁴ que reporta un contenido de cenizas de 0,53%, y menor que el contenido de cenizas (0,4 %) reportado por Corrales (2014)⁶⁵; en cambio, la determinación de vitamina C

(31,67 mg%), no difiere en demasía de los resultados obtenidos en la Tabla Peruana de Composición de Alimentos, 2009 (24,8 mg%).⁶³

Las pruebas bromatológicas de acidez titulable y los grados Brix de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) dieron como resultados 0,25 % y 18,8 °Brix, estos resultados son mayores a los descritos por Caez (2012)⁶⁶ 0,052 % y 13,3°Bx respectivamente. Encina (2014)⁶⁴ encuentra un contenido mayor para la acidez titulable (0,51 %) y menor para la prueba de sólidos solubles (14, 5°Brix) al igual que Moreno (2009)⁶⁸ que reporta un 0,39% de acidez titulable y 15,4°Bx. En tanto que el valor de pH encontrado (4,34) es similar al encontrado por Encina (2014)⁶⁴ pH 4,32 y menor al reportado por Caez (2012)⁶⁶ pH 5,18.

Dado que a temperaturas elevadas y en presencia de luz, los colorantes naturales tienden a sufrir ciertas alteraciones; la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. se almacenó entre 2°C - 8 °C y protegida de la luz.

La cromatografía de capa fina de la muestra del colorante se comparó con su estándar de mangiferina, debido a que este componente se encuentra en la pulpa de mango como en otras partes del fruto (cáscara y semilla).⁶⁹

La muestra y el estándar se eluyeron en la fase estacionaria (silica gel G60 F254) y se eligió como mejor sistema de solventes al metanol, teniendo en cuenta la polaridad de la mangiferina y luego de probar con otros solventes como: agua destilada, etanol de 96°, agua destilada: etanol de 96° (1: 1) y acetato de etilo. Se identificó una coloración amarilla propia de las xantonas y el Rf de la muestra (0,35) fue cercano al Rf del estándar de mangiferina (0,36), evidenciando la presencia de este componente.

La obtención de colorantes naturales, provenientes de vegetales como el caso de los frutos, está condicionada por factores que los afectan como las condiciones de tratamiento y el tipo de muestra empleada. La mangiferina, una xantona natural, ha sido reportada como el compuesto químico responsable de proporcionar el color al mango; encontrándose en varias partes del fruto.^{8, 70}

De forma similar Acosta (2016)⁷¹ y Ali (2007)⁷², consideraron el tipo de solvente como un factor importante, determinándose experimentalmente como mejor solvente para la mangiferina, colorante presente en la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., al etanol de 96°.

También se ha encontrado como factor relevante el pH, Uddin (2015)⁷⁰ describe que a un pH de 10 se obtiene mayor componente colorante y se debería a que en medio alcalino, la presencia de grupos fenólicos ácidos en la molécula de mangiferina, reaccionarían con álcalis, formando sales solubles, por lo tanto, la solubilidad del colorante incrementó debido al aumento de la ionización de los grupos hidroxilo (fenóxido) en medio alcalino. Así mismo, se describe la influencia que ejercen la temperatura y tiempo de extracción en la obtención del colorante natural.⁷⁰

En este estudio se realizaron pruebas preliminares para la elección de los factores que influyen en la obtención del colorante. Así, se determinó que la relación entre muestra y solvente, el pH y el tiempo influyen en la obtención; pero se estableció como mejor solvente el etanol de 96° y en cuanto al incremento de la temperatura, no fue favorable en la obtención del colorante. Acosta (2016), encuentra que, a temperatura ambiente, la mangiferina fue moderadamente soluble en etanol, ligeramente soluble en metanol y agua destilada, y prácticamente insoluble en éter etílico, acetona y n-hexano; manteniendo la secuencia a diferentes temperaturas de tratamiento.⁷¹

En la segunda etapa de la investigación se utilizó un diseño factorial como siguiente prueba tamiz para determinar qué factores y cómo influyen en la obtención del colorante. En esta etapa, la mayor obtención del colorante fue de 48,5462 µg/µL a una relación entre muestra y solvente de 20%, pH 9 y 2 horas.

La relación entre muestra y solvente se evaluó a distintos niveles, seleccionados en base a las pruebas preliminares, siendo: 10%, 20% y 30%, donde se observó una mayor concentración del colorante a una relación entre muestra y solvente de 20 % a diferencia del 30% donde se da una gran disminución, evidenciando una saturación del sistema de extracción.

A un pH de 10, donde habría mayor cantidad de álcali para la reacción con los grupos fenólicos ácidos de la mangiferina, la concentración del colorante es menor a comparación del pH 9, donde la concentración del colorante se incrementa. Por ende, en la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., se obtiene mayor cantidad del colorante a pH 9 (figura 13) que, a un pH alcalino más elevado, a diferencia de los resultados obtenidos por Uddin (2015), donde reporta un aumento en la concentración de mangiferina a un pH de 10.

Respecto al tiempo, el diseño factorial indicó que en 2 horas se obtuvo mayor concentración del colorante, lo que acorta el intervalo de los niveles del factor tiempo a evaluar en la etapa de optimización.

El uso de un diseño factorial ofrece la ventaja de una mejor selección de los factores utilizados en el diseño Box Behnken.⁵⁶ De la evaluación se dedujo que a un nivel medio de M/S (%) resulta mayor la obtención del colorante, por lo que el nivel central se mantuvo como tal para el diseño Box Behnken acortando solo el nivel inferior y superior, para el caso del factor pH, se acortaran los niveles usando como límites el pH 8,5 y 9,5; y en el caso del factor tiempo se acortaran los niveles haciéndolos más cercanos al nivel medio que fue donde se observa la mejor obtención del colorante.

En la última etapa, el diseño Box Behnken determinó las superficies respuesta teniendo como variable de respuesta la concentración del colorante, los niveles para el desarrollo del diseño se muestran en la Tabla 14.

A diferencia de la tendencia del diseño factorial, donde en los valores centrales (20%, pH 8 y 2 horas) se obtuvo una mayor concentración del colorante, en los resultados del diseño Box Behnken (Tabla 42) la mayor concentración del colorante se observó a un valor ligeramente mayor de M/S (%) (20,5 %), sucediendo lo mismo en los factores pH (9,1) y tiempo (2,16 horas).

Para establecer los gráficos de superficie de respuesta (Figura 18-20) se relacionaron 2 factores, mientras que el tercero se mantuvo en su nivel intermedio.⁵⁶ Las condiciones óptimas de extracción fueron determinadas mediante el análisis de maximización de respuesta empleando el programa estadístico Minitab 18, siendo

las condiciones óptimas 20,1 %, pH 9,1 y un tiempo de 2,16 horas para un resultado experimental de 49,0921 µg/µL de concentración del colorante, siendo mayor al obtenido por Forero (2016) en la corteza de la variedad Rosa, 4 906,2±95 mg/100 g de mangiferina.⁴⁰

Luego de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L., se evaluó según parámetros establecidos por el Comité Mixto de Expertos FAO/WHO para otros colorantes amarillos, debido a que el colorante mangiferina no está considerado en su lista de aditivos colorantes. Se tuvo como resultado para la prueba de materia volátil un porcentaje de 7,56 %, estando dentro del valor de aceptación (<15 %) según el Comité Mixto de Expertos FAO/WHO (2011); para el colorante tartrazina y amarillo ocaso.⁷³

El valor de materia insoluble en alcohol fue de 0,17 % y de materia insoluble en agua, 0,12 %, estando dentro de lo requerido (<0,2 %) para los colorantes tartrazina y amarillo ocaso.⁷³ Mientras que la materia extraíble en éter fue de 0,11 %, cumpliendo con los requerimientos del Comité Mixto de Expertos FAO/WHO, (2011); para los colorantes tartrazina y amarillo ocaso (<0,2 %).⁷³

El porcentaje de cloruros hallado (2,73 %) y el porcentaje de sulfatos (3,53 %); fueron determinados según los métodos expuestos por el Comité Mixto de Expertos FAO/WHO (2011).⁷³

El análisis de plomo dio como resultado 0,196 mg/kg, valor dentro de lo requerido para los colorantes tartrazina, azafrán y amarillo ocaso (<2 mg/kg)⁷³ y en cuanto al análisis de arsénico, su resultado (0,097 mg/kg) también estuvo dentro de lo requerido para el colorante azafrán (<3 mg/kg).⁷³

En la aplicación del colorante a un producto como la gelatina, obtuvimos buenos resultados, ya que se mantuvo estable alrededor de cinco días aproximadamente a temperatura ambiente, conservando buenas características organolépticas y fisicoquímicas.

La reducción de procesos unitarios para la obtención del colorante se ve favorecida al encontrar las condiciones óptimas determinadas en el presente estudio ya que constituyen el primer paso en la optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L y permitirá obtener una mayor concentración del colorante.

Para poder interpolar el proceso de obtención del colorante a nivel industrial, se requieren analizar otras variables de estudio como la sonicación y velocidad de agitación.

6. CONCLUSIONES

- Los parámetros seleccionados fueron: relación entre muestra y solvente, el pH y el tiempo como factores determinantes en la extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).
- Mediante la metodología Superficie Respuesta por el diseño Box Behnken, se establecieron los parámetros óptimos de extracción del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) a una relación entre muestra y solvente de 20,5 %, pH 9,1 y 2,16 horas para un resultado experimental de 49,0921 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Siendo de utilidad ya que permiten reducir los procesos para la obtención óptima del colorante con buenas características organolépticas y una mayor concentración.
- Se evaluó y analizó el colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) obtenido a condiciones óptimas cuyo resultado de las pruebas dieron valores dentro de los límites establecidos para otros colorantes amarillos como tartrazina, azafrán y amarillo ocaso.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar sobre otros factores que pudiesen optimizar la obtención del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. para mejorar su aplicación en productos alimentarios.
- Realizar estudios de la incorporación del colorante de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. en diferentes productos alimentarios como: conservas, bebidas y lácteos.
- Llevar a cabo estudios de optimización de la obtención del colorante de la cáscara del fruto de *Mangifera indica* L.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. September-Malaterre A., Stanislas G., Douraguia E., Gonthier M. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya passion fruit a pineapple cultivated in Reunion French Island. Food Chemistry. 2016; 212: 225-233.
2. García J., Castaño M., Osorio C. Caracterización fisicoquímica de cáscaras de mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananascomosus*) y banano (*Musa paradisiaca*) como material de partida para alimentos biofuncionales. Agron. Colomb. 2016; 34: 911-913.
3. Jaramillo L. Aislamiento y selección de rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L. (mango). [Tesis en internet, para optar el grado académico de Bachiller]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Escuela Profesional de Parasitología y Microbiología; 2012 [citado 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/7327>
4. Ribeiro S.M.R., Schieber, A. Bioactive compounds in mango (*Mangifera indica* L.). Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables. 2010; 37:507–523.
5. Juhurul M.H., Zaidul I.S., Ghafoor K., Al-Juhaimi F.Y., Nyam K.L., Norulaini N.A., et al. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: a review. Food Chemistry. 2015; 183: 173-180.
6. Tharanathan R.N., Yashoda H.M., Prabha T.N. Mango (*Mangifera indica* L.), “the king of fruits”- an overview. FoodReviews International. 2007; 22: 95-123.
7. Manthey J.A., Perkins-Veazie P. Influences of harvest date and location on the levels of beta-carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (*Mangifera indica* L.). FoodChem. 2009; 57:10825-10830.
8. Luo F., Lv Q., Zhao Y., Hu G., Huang G., Zhanget J., et al. Quantification and purification of mangiferin from chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars

- and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H₂O₂-induced stress. *Molecular Sciences*. 2012; 13: 11260-11274.
9. Baliarsingh S., Jena J., Das T., Das N. Role of cationic and anionic surfactants in textile dyeing with natural dyes extracted from waste plant materials and their potential antimicrobial properties. *Industrial Crops and Products*. 2013; 50: 618-624.
 10. García M. Desarrollo de microencapsulados enriquecidos en carotenoides a partir de residuos de frutas tropicales para uso como colorantes naturales en alimentos. [tesis magister en internet]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2017 [citado 16 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/57714/1/TESIS.JULIANA.FINAL.pdf>
 11. Pompeu D., Silva E.M., Rogez H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpeoleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*. 2009; 100(23): 6076-6078.
 12. Ballard T.S., Mallikarjunan P., Zhou K., O'Keefe S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*. 2010; 120(4): 1185-1192.
 13. Shokuhfar A., Khalili S.M.R., Ashenai F., Malekzadeh K., Raissi S. Analysis and optimization of smart hybrid composite plates subjected to low-velocity impact using the response surface methodology (RSM). *Thin-Walled Structures*. 2008; 46(11): 1204-1212.
 14. Zhidong L., Benheng G., Xuezhong C., Zhenmin L., Yun D., Hongliang H., et al. Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using Response Surface Methodology. *Agricultural and FoodResearch*. 2013; 52(1): 53-65.
 15. Mukherjee S. K. Origin of Mango (*Mangifera indica*). *Economic Botany*. 1971; 260-264.
 16. Parrotta J. (*Mangifera indica* L.) Mango. Southern Forest Experiment Station. 1993; 338-343.

17. Yadav D., Singh S. Mango: History, origin and distribution. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017; 6(6): 1257-1262.
18. Coello A., Fernández D., Galán V. Guía Descriptiva de Cultivares de Mango. Canarias: Departamento de Fruticultura Tropical, Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. España: Litografía Gráficas Sabater; 1997.
19. De la Cruz J., García H. S. MANGO: Post-harvest Operations [Internet]. Veracruz: Instituto Tecnológico de Veracruz. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2002 [citado 18 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-av008e.pdf>
20. Lauricella M., Emanuele S., Calvaruso G., Giuliano M., D'Anneo A. Multifaceted health benefits of *Mangifera indica* L. (Mango): The Inestimable Value of Orchards Recently Planted in Sicilian Rural Areas. Nutrients. 2017; 525(9): 1-14.
21. Wall-Medrano A., Olivas F., Velderrain G., González A., De la Rosa L., López J., et al. El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud. NutrHosp. 2015; 31(1): 67-75.
22. Pereira S., Mares D., Castello E., Duarte A. Determination of synthetic dyes in selected food stuffs by high performance liquid chromatography with uv-dad detection. Food Chemistry. 2008; 107:489-496.
23. Martins N., Lobo C., Morales P., Barros L., Ferreira I. Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. Trends in Food Science & Technology. 2016; 52:1-15.
24. Carmona I. De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Agrimundo. Santiago de Chile: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA); 2013.
25. Azeredo H. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. International Journal of Food Science and Technology. 2009; 44: 2365-2376.
26. Moral M. Estudio de los Colorantes Alimentarios para su aplicación en las Bellas Artes". [tesis doctoral en internet] Madrid: Universidad Complutense de

- Madrid; Facultad De Bellas Artes; 2017 [citado 16 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/1724/>
27. Granados E. Caracterización del color caramelo por espectrofotometría molecular de UV-visible e infrarrojo en bebidas refrescantes. [tesis en internet, para optar el título de Ingeniero químico industrial] México: Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas; 2013 [citado 16 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/16910>.
 28. Vergara C. Extracción y estabilización de betalaínas de tuna púrpura (*Opuntia ficus indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario. [Tesis doctoral en internet]. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos; 2013 [citado 17 de octubre de 2018]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/114868/vergara_cc.pdf
 29. Restrepo M. Sustitución de colorantes en alimentos. Revista lasallista de investigación. 2007; 4(1): 35-39.
 30. González J., Seijas N., Seijas P. Efecto de la temperatura y luminosidad sobre la estabilidad de las betalaínas obtenidas de “betarraga”. Sciendo. 2010; 13(2): 1-8.
 31. Carajulca L., Camilo H. Concentración de Tartrazina en cereales caseros expendidos en el mercado mayorista, Trujillo-La Libertad. [tesis en internet, para optar el grado académico de bachiller]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015 [citado 17 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3621>
 32. Norma General para el etiquetado de los alimentos preenvasados (CODEX STAN 1-1985) [actualizada en el 2010]. [citado 18 de noviembre de 2018]; 1985. Disponible en: www.fao.org/input/download/standards/32/CXS_001s.pdf
 33. Norma General para los aditivos alimentarios (CODEX-STAN 192-1995) [actualizado en el 2018]. [citado 18 de noviembre 2018]; 1995. Disponible en:

<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/about/es/>

34. FDA.org [Internet] Color Additives: FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives. [Actualizado en el 2017; citado 19 nov 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/regulatoryprocesshistoricalperspectives/>
35. Soriano J., Franco M., Pelayo C., Armella M., Yáñez M., Guerrero I. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la "jiotilla" (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose). Revista mexicana de Ingeniería Química. 2007; 6(1): 19-25.
36. López N. "Determinación de colorantes alimentarios en productos alimenticios del mar". [tesis máster en internet]. España, Almería: Universidad de Almería. Departamento de Hidrología y Química Analítica; 2011. [citado 19 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/487/DETERMINACION%20DE%20COLORANTES%20ALIMENTARIOS%20EN%20PRODUCTOS%20ALIMENTICIOS%20DEL%20MAR-L%20PEZ%20GUTIERREZ%20NOELIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
37. FAO.org [Internet]. Inocuidad y calidad de los alimentos [actualizado en el 2018; citado 20 nov 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/about/es/> .
38. FAO.org [Internet]. Online Edition: "Combined Compendium of Food Additive Specifications" [actualizado en el 2011; citado 15 nov 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>
39. Ministerio de salud, DIGEMID. [Internet]. Listado de colorantes [citado 25 junio 2018]. Perú; 2012. Disponible en: http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/RD_139_2012.pdf

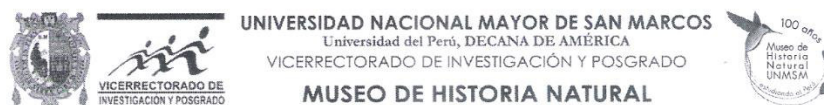
40. Forero L. F., Patricia P. A. Extracción, purificación y cuantificación de mangiferina en la corteza de algunos cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). Revista colombiana de Ciencias Hortícolas. 2016; 10(2): 292-300.
41. Scartezzini P., Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 71: 23-43.
42. Martins C., Rigo L. Mangiferin and Naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2015; 151: 239-247.
43. Casas L., Mantell C., Fernández T., Martínez J., inventores; Universidad de Cádiz, titular. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial. España patente ES 2 567 530 B1. 2017 jun 02.
44. Ferreira F., Barros I., Catari E., Salles M., Olea C., Pérez F., et al. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with β -cyclodextrin. LWT-Food Sci. Technol. 2013; 51(1): 129-134.
45. Kulkarni V.M., Rathod V.K. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* L. leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. Industrial Crops and products. 2014; 52: 292-297.
46. Lenth R. Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials. Technometrics. 1989; 31(4): 469-473.
47. Rushing H., Carl A., Wisnowsky J. Introduction to Factorial Designs En: Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery: A Supplement for Using JMP. Carolina del Norte: SAS Institute Inc ediciones; 2013. p. 77-97.
48. Jones B. Split-Plot Designs: What, Why, and How. Journal of Quality Technology. 2009; 41(4): 341-361.
49. Mäkelä M. Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. Energy Conversion and Management. 2017; 151: 630-640.
50. Sabanis D., Lebesi D. y Tzia C. Development of fibre-enriched gluten-free bread: a Response Surface Methodology study. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2009; 60: 174-190.

51. Sinha K., Das Saha P., Datta S. Extraction of natural dye from petals of Flame of forest (*Butea monosperma*) flower: Process optimization using response surface methodology (RSM). *Dyes and Pigments*. 2012; 94: 212-216.
52. Amauzgar P., Khalil A., Salamatinia B., Zuhairi A., Issam A. Optimization of Bioresource material from oil palm trunk core drying Using Microwave Radiation; a response surface methodology application. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 8396-8401.
53. Mutalik S., Vaidya B.K., Joshi R.M., Desai K.M., Nene S.N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rodhococcus spp* MTCC 2574. *Bioresource Technology*. 2008; 99:7875-7880.
54. Arias A. Optimización de la producción de carotenoides por *haloferax* sp. utilizando el método de superficie de respuesta. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014.
55. Dong S., Xie X., Wang X., Zhan Y., Yao Y. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food and Bioproducts Processing*. 2009; 87: 139-144.
56. Box, G.E.P., Hunter, W.G. And Hunter, J.S. *Statistics for Experimenters*. USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. p. 510-539.
57. Khajeh M. Response surface modelling of lead pre-concentration from food samples by miniaturised homogenous liquid-liquid solvent extraction: Box-Behnken design. *Food Chemistry*. 2011; 129: 1832-1838.
58. Lock O. *Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales*. 2da ed. Lima: fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
59. Gorriti A., Córdova A., Jurado B., Retuerto M., Acosta K. *Manual de Laboratorio de Farmacognosia I*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
60. Horwitz W. *Official methods of analysis of AOAC International*. 20va ed. USA: Editorial Board; 2012.

61. INACAL. NTP 209.214:1984. Colorantes de uso permitido en alimentos. Métodos de ensayo. 1ª. Edición. 2010.
62. Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 39 & NF 34. USA: The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD; 2016. p. 2166-2168, 2048.
63. García M., Gómez-Sánchez I., Espinoza C., Bravo F., Ganoza L. Tabla peruana de composición de alimentos. 8va ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto nacional de salud; 2009.
64. Encina R., Bernal A., Rojas D. Efecto de la temperatura de pasteurización y proporción de mezclas binarias de pulpa de carambola y mango sobre su capacidad antioxidante lipofílica. Ingeniería Industrial. 2013; 8(31): 197-219.
65. Corrales-Bernal A., Maldonado M., Urango L., Franco M., Rojano B. Mango de azúcar (*Mangifera indica* L.), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. RevChilNutr.2014; 41(3):312-318.
66. Caez K., Jaraba N. Microencapsulación del jugo de mango (*Mangifera Indica* L.) para la obtención de un concentrado con la utilización de maltodextrina como material pared. [Tesis en internet, para optar el título de Ingeniero de Alimentos] Cartagena: Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería; 2012 [citado 20 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unicartagena.edu.co:8080/jspui/bitstream/11227/1398/1/INFORME%20OFICIAL%20pdf.pdf>
67. Arias A., Sgroppo S., Zaritzky N. Caracterización fisicoquímica de dos variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Argentina: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas; 2009.
68. Moreno A., León D., Giraldo G., Ríos E. Estudio de la cinética fisicoquímica del mango (*Mangifera indica* L. Var. Tommy Atkins) tratado por métodos combinados de secado. Dyna.2010; 77(162): 75-84.
69. Ribeiro S.M., Barboza L., Queiroz J., Knodler M., Schieber A. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Brazilian Mango (*Mangifera indica* L.) Varieties. Food chemistry. 2008; 110: 620–626.

70. Uddin M. Extraction of eco-friendly natural dyes from mango leaves and their application on silk fabric. *Textiles and Clothing Sustainability*. 2015; 1(7): 1-8.
71. Acosta J., Sevilla L., Salomón S., Nuevas L., Romero A., Amaro D. Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2016; 4(2): 49-53.
72. Ali, S. Evaluation of cotton dyeing with aqueous extracts of natural dyes from indigenous plants [PhD tesis en internet]. Faisalabad, Pakistan: University of Agriculture. Department of Chemistry; 2007 [citado 25 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://prh.hec.gov.pk/jspui/bitstream/123456789/863/2/665S.pdf>
73. FAO. Online Edition: "Combined Compendium of Food Additive Specifications" [actualizado en el 2011; citado 15 nov 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>

ANEXOS



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N°093 -USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con fruto) recibida de **Rosario Isabel PAUCAR ANDIA** y **Albert Hans NARCISO VALVERDE**, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Mangifera indica* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).
DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: ANACARDIACEAE

GENERO: *Mangifera*

ESPECIE: *Mangifera indica* L.

Nombre vulgar: "mango de chupar"
Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 13 de marzo de 2018



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: muscohn@unmsm.edu.pe
<http://muscohn.unmsm.edu.pe>

Figura 23. Constancia de clasificación taxonómica de *Mangifera indica* L.



Figura 24. Clasificación de la fruta de *Mangifera indica* L. (mango).



Figura 25. Pesado de la fruta de *Mangifera indica* L. (mango).

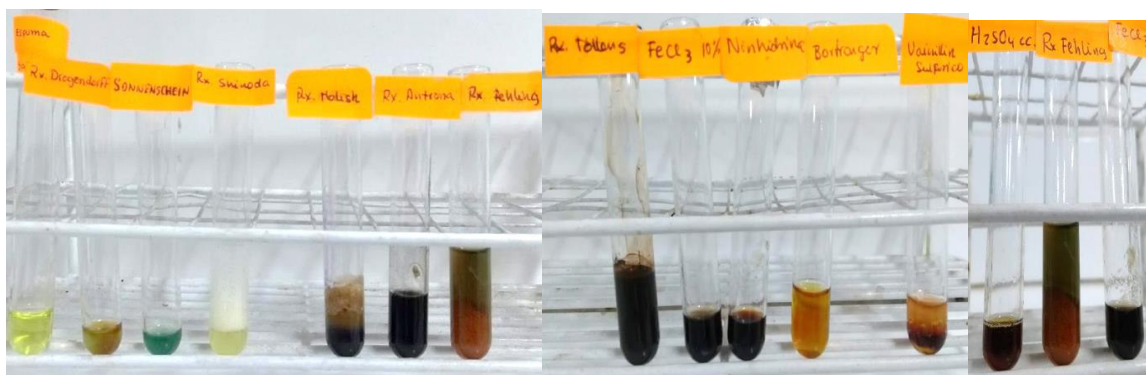


Figura 26. Análisis Fitoquímico de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango)

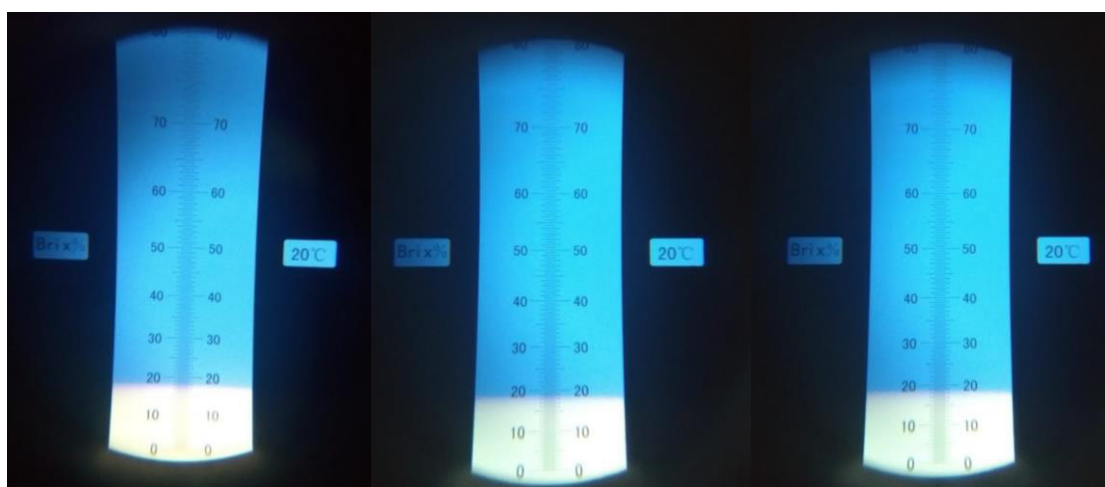


Figura 27. Medida de grados Brix del fruto de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango).

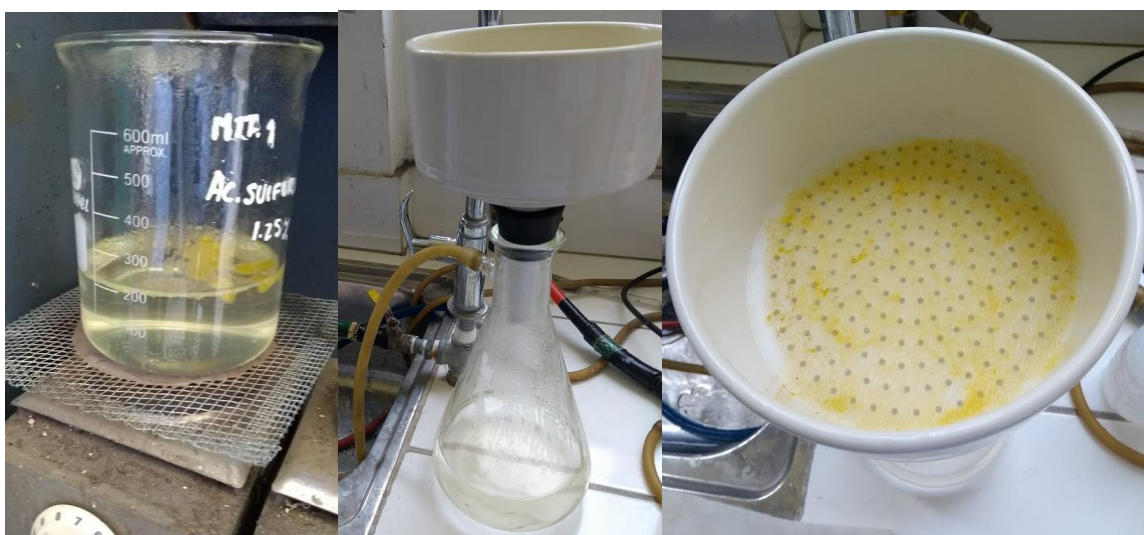


Figura 28. Determinación de fibra.



Figura 29. Determinación de proteínas.



Figura 30. Determinación de proteínas, etapa de destilación.



Figura 31. Determinación de azúcares reductores directos.



Figura 32. Determinación de grasas.

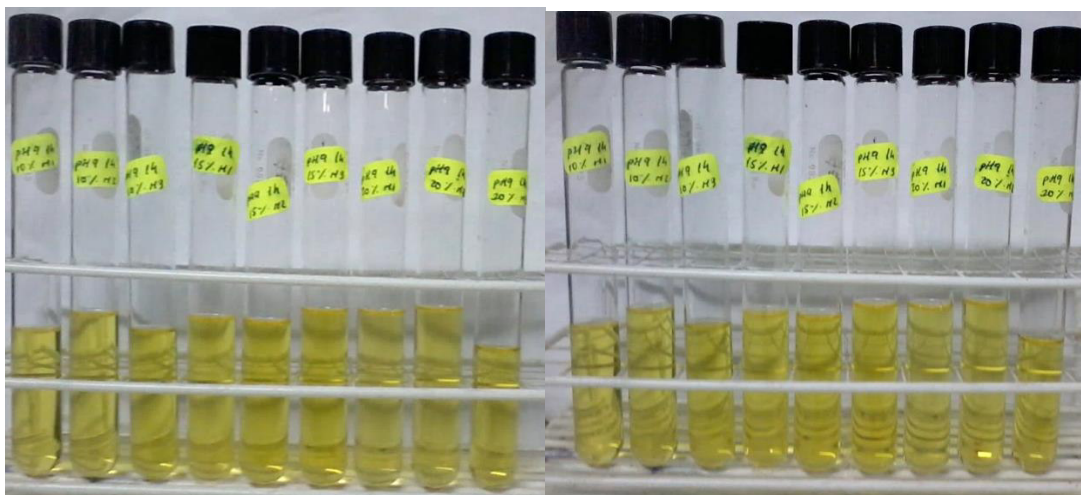


Figura 33. Ensayos según el diseño Box Behnken para análisis organoléptico.



Figura 34. Extracto del colorante obtenido de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) según las condiciones óptimas.



Figura 35. Determinación de cloruros del colorante obtenido de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) según las condiciones óptimas.



Figura 36. Ensayo de solubilidad del colorante obtenido de la pulpa del fruto de *Mangifera indica* L. (mango) según las condiciones óptimas.



Figura 37. Prueba de estabilidad con diferentes pH y temperatura.

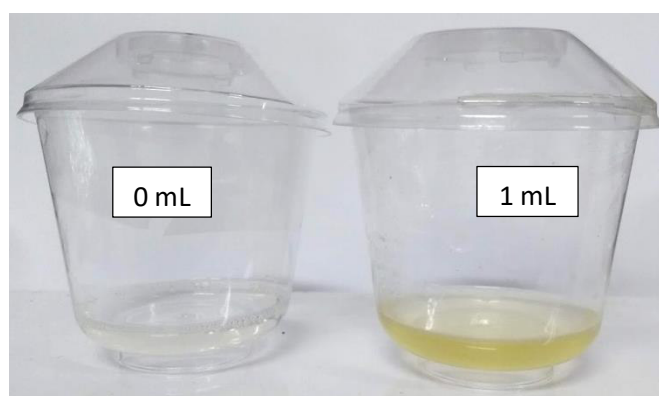


Figura 38. Prueba de aplicación de 0 y 1 mL del colorante en gelatina.

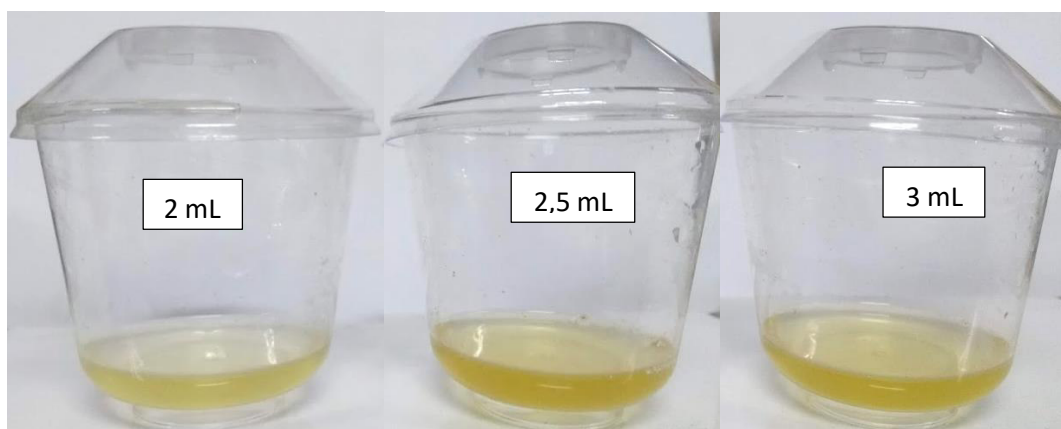


Figura 39. Prueba de aplicación de 2, 2,5 y 3 mL del colorante en gelatina.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental-CICOTOX



Nº	87060	-	87061
----	-------	---	-------

PROTOCOLO DE ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

SOLICITANTE: Sra. Rosario Paucar Andia

FECHA DE RECEPCIÓN: 03 de Octubre de 2018 HORA: 10:35 a.m.

FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS: 17 de Noviembre de 2018 HORA: 09:30 a.m.

FECHA DE TÉRMINO DE ANÁLISIS: 24 de Noviembre de 2018 HORA: 10:40 p.m.

MÉTODOS:

Determinación de Plomo por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito.

Determinación de Arsénico por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros.

Nº ANÁLISIS	MUESTRA	ANÁLISIS CUANTITATIVO	RESULTADO
87060	Extracto colorante de mango	Cuantificación de Plomo	0.196 mg/kg
87061	Extracto colorante de mango	Cuantificación de Arsénico	0.097 mg/kg

Lima, 24 de noviembre de 2018


Director de CICOTOX

Dr. José A. Apesteguía Infantes

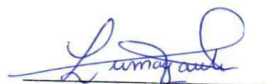
Esp. Toxicología & Química Legal

C.Q.F.P. N° 06538

RNE 240

D.N.I. N° 09359857




Analista

Lizbeth M. Pumayauli Almanza

RECOGE RESULTADO

NOMBRE: PAUCAR ANDIA ROSARIO ISABEL

D.N.I: 72454613

FECHA: 25-11-18

FIRMA: 

HORA: 9:00 am

IMPORTANTE: Cualquier reclamo se atenderá en un plazo máximo de 30 días de recepcionado el resultado

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú Teléfonos: (511) 328-7700 Ap. Postal 4559 - Lima 1

E-mail: cicotox.farmacia@unmsm.edu.pe

http://farmacia.unmsm.edu.pe

Figura 40. Resultados de análisis de plomo y arsénico.